

Reparasjon av oksidative DNA-skader i spermatogonier og sertoliceller fra neonatale mus

Kirsti Roksvåg



Masteroppgave i Toksikologi

Avdeling for Toksikologi

Biologisk Institutt

UNIVERSITETET I OSLO

OKTOBER 2012

Forord

Arbeidet presentert i denne masteroppgaven ble utført ved Avdeling for kjemikalier og stråling (MIKS), Divisjon for miljømedisin, Folkehelseinstituttet, i tidsperioden fra august 2010 til oktober 2012 for å oppnå mastergrad i toksikologi ved Universitetet i Oslo. Forsker Ann-Karin Olsen og forsker Kristine B. Gützkow har vært mine hovedveiledere og forsker Birgitte Lindeman medveileder. Internveileder har vært professor Steinar Øvrebø ved Biologisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Anka, Kristine og Birgitte! Tusen takk for super veiledning gjennom det siste intensive året. Takket være oppmuntring og gode råd fra dere har det vært spennende og lærerikt. Entusiasmen dere har for det dere driver med er beundringsverdig og inspirerer meg. Takk til avdelingsleder Gunnar Brunborg for at jeg fikk skrive oppgaven min hos dere - gjengen din er en fantastisk MIKS! Tusen takk til medstudentene mine, Solveig og Hanne, for at dere svarte på mine mange spørsmål i starten. Jeg er spesielt takknemlig for alle de rådene jeg ikke visste at jeg trengte. Anne, uten deg ville innspurten ha blitt betydelig tyngre, tenk om alle masterstudenter kunne fått råd og omtanke av en stipendiat som deg.

Mads - jeg er så glad for at du har vært her for meg, og for at du tok meg sånn akkurat passe seriøst de dagene jeg ikke ville ha noen mastergrad likevel. Tusen takk for at du har hentet meg etter sene kvelder på lab – og pushet meg ut av senga dagen etter. Du er den beste! Jeg vil også takke familie og venner for støtte og en påminnelse om at det er et liv i tillegg til mastergraden.

Oktober, 2012.

Kirsti Roksvåg

Oppsummering

Levende organismer er kontinuerlig utsatt for påvirkninger som kan skade DNA. Dette inkluderer oksidative DNA-skader som oppstår via normal metabolisme i cellene og fra en rekke miljøkemikalier. Reparasjon av oksidative DNA-skader skjer hovedsakelig via baseeksisjonsreparasjon (BER). Dersom DNA-skadene ikke blir reparert, kan det føre til celletap eller mutasjoner. Oksidative DNA-skader er også assosiert med redusert spermkvalitet.

Genomets integritet i testikkelceller er svært viktig fordi cellene overfører informasjonen til neste generasjon. Genetisk skade i spermcellen kan medføre endringer i fosterutviklingen og sykdom i avkommet. Avdelingen hvor denne oppgaven utføres har foreslått miljøeksponeringer som en av årsakene til en observert redusert fertilitet hos menn. Avdelingen har tidligere vist klare forskjeller mellom mennesker og gnagere i evnen til å reparere visse typer oksidative DNA-skader i post-meiotiske og meiotiske kjønnsceller. Menneskets meiotiske og post-meiotiske testikkelceller hadde liten eller ingen evne til å reparere oksiderte puriner. Det er imidlertid lite kunnskap om DNA-reparasjon i spermatogonier og spesielt stamcellene i testikkelen. Dette er til dels fordi de har vært vanskelige å studere grunnet lavt antall testikkelceller i neonatale (nyfødte) gnagere, og svært lavt relativt antall spermatogonier i kjønnsmodne dyr. Testikkelcellene i neonatale dyr er spesielt interessante fordi deres mottakelighet og respons på DNA-skader legger grunnlaget for fertilitet resten av livet. Mitotiske spermatogonier og sertoliceller kan være mer utsatt for DNA-skade på grunn av sin lokalisering sammenliknet med meiotiske og postmeiotiske kjønnsceller som ligger innenfor blod-testikkelbarrieren. På grunn av sine roller som forløperceller bør de beholde sin genomiske integritet og det er antatt at neonatale spermatogonier og sertoliceller har funksjonell og effektiv reparasjon av DNA-skader. Sertoliceller har en sentral rolle som støtteceller for kjønnscellene og til tross for dette er DNA-skaderesponsen i aktivt delende sertoliceller i neonatale dyr et utforsket område.

Hovedmålet for denne oppgaven er å bidra til god reproduktiv helse, ved å avklare mekanismer som har betydning for DNA-skader i testikkelceller. Økt kunnskap om testikulære spermatogonier (deriblant stamceller) og støtteceller (sertoliceller) i neonatale dyr vil bidra til dette målet. Vi har derfor studert effekten av oksidativ stress på DNA i disse celletypene. Dette ble utført ved å etablere en metode for enzymatisk isolasjon av testikkelceller fra 5-7 dager gamle mus. Deretter ble separate kulturer av spermatogonier og sertoliceller anriket. Cellene ble utsatt for oksidativ DNA-skade ved å eksponere dem for Ro 12-9786 sammen med synlig lys *in vitro* hvor 8-okso-7,8-dihydroguanin (8-oksoG) utgjør en stor andel av skadene. Denne spesifikke skaden ble kvantifisert ved bruk av enzymet Formamidopyrimidine DNA-glykosylase (Fpg) fra *Escherichia coli* (*E. Coli*) i kometmetoden. Reparasjonskapasiteten til celletypene ble studert ved å måle det

gjenværende nivået av induisert oksidativ skade og skadenivå etter fem timer. Resultatene indikerer at neonatale spermatogonier og sertoliceller er like mottakelige for oksidative skader ved lav dose, men at sertoliceller akkumulerer DNA-skader ved høyere doser. Den manglende reparasjonen i sertoliceller ved høy eksponeringsdose kan skyldes en generell stressrespons eller en metning av reparasjonskapasiteten. Videre tyder resultatene på at neonatale spermatogonier har bedre kapasitet til å reparere oksidative DNA-skader enn sertoliceller. Redusert reparasjonskapasitet i neonatale sertoliceller vil gi konsekvenser for produksjon av modne kjønnsceller, siden de ikke får den støtten de trenger. Vår hypotese er at skadet DNA i neonatale spermatogonier og sertoliceller, samt tidlig tap av testikkelceller grunnet cytotoxisitet kan medvirke til nedgang i mannens fertilitet og økt forekomst av mutasjoner i sperm. I videre arbeid er det ønskelig å forfølge resultatene i denne masteroppgaven ved å studere responsen til neonatale testikkelceller i et miljø som reflekterer situasjonen *in vivo*.

Summary

Living organisms are continuously exposed to agents damaging their DNA. This includes oxidative DNA damage which results from both metabolism within the cell and exposure to a variety of environmental chemicals. Oxidative DNA damage is mainly repaired by base excision repair (BER). Absence of BER may lead to cell loss or mutation. From a male reproductive perspective oxidative DNA damage is shown to be linked to reduced sperm quality.

The integrity of DNA in testicular cells is considered important since these cells transfer information to the next generations. Genetic damage in the sperm cell may result in changes in the development of the fetus or in reduced offspring health. The Department of Chemicals and Radiation (MIKS) where this study was carried out, has suggested exposure to environmental chemicals as one causal factor with respect to men's reduced fertility. The department has in previous studies shown a clear difference in human's and rodent's testicular cells concerning the ability to repair oxidative DNA damages in meiotic and post-meiotic male germ cells. Meiotic and post-meiotic testicular cells from humans showed little or no repair of oxidative purines. There is however very limited knowledge on DNA-repair in the progenitor cells, in spermatogonia and especially in the spermatogonial stem cells. The lack of knowledge can partly be explained by the very small relative number in mature rodents and the low number of testicular cells in neonatal rodents. The testicular cells in neonatal animals are especially interesting since their sensitivity towards, as well as their ability to repair and response to, exposure to DNA damage constitute a basis for the fertility of the male throughout life. Mitotic spermatogonia and Sertoli cells might be more exposed to DNA-damage due to their physiological location outside of the blood-testis-barrier compared to meiotic and post-meiotic germ cells which are located within this barrier. As a consequence of their role as precursor cells, neonatal spermatogonia and immature Sertoli cells are likely to have developed efficient systems to protect their genome integrity, of which one such defense system is functional and efficient DNA repair. Sertoli cells have a central role as nurturing and support cells to the male germ cells, and despite of this, the response to DNA damage in proliferating Sertoli cells is still largely unexplored.

The main goal in this project is to contribute knowledge to better take understand challenges concerning male reproductive health, by investigating mechanisms of DNA repair in testicular cells. To accomplish this we study the effect of oxidative stress in testicular spermatogonia (including stem cells) and the supporting cells (Sertoli) in neonatal animals. This was done by first establishing a method for enzymatic isolation of testicular cells from 5-7 day old mice. This was followed by enrichment of separate cultures of spermatogonia and Sertoli. Oxidative DNA damage was specifically induced by exposing the cells *in vitro* with a phototoxic compound Ro 12-9786 and light. The induced damage consists primarily of damages

DNA bases such as 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxo-G) lesions. The DNA damage was quantified by including the Formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg) in the single cell gel electrophoresis method, also known as comet assay. The relative repair efficiencies were calculated based on DNA lesion levels measured at the time of DNA damage induction (time=0) and after five hours of incubation to allow repair. The results indicate that spermatogonia and Sertoli cells from neonatal mice have similar sensitivity to oxidative damage at low doses, whereas Sertoli cells accumulate oxidative damage at higher doses. The higher doses may be cytotoxic to the Sertoli cells, and not to spermatogonia. Furthermore, the results indicate that spermatogonia have more efficient DNA repair compared to the Sertoli cells. Limited repair capacity in immature Sertoli cells can indirectly affect the production of mature germ cells, because if the limited DNA repair directs cell to rather be eliminated than repaired, there may be fewer Sertoli cells present in the testicle to support male germ cells. The observed decline in men's fertility may be partly explained by damage to the DNA of both spermatogonia and Sertoli cells, including early loss of testicular cells caused by cytotoxicity. In further studies the results should be pursued in testicular cells kept within their normal physiological context *in vivo*.

Forkortelser

| | |
|-------------------|---|
| 8-oksoG | 8-okso-7, 8-dihydroguanin |
| A | Adenin |
| A _{al} | A "aligned" = spermatogonier i rekker (mus) |
| A _{pr} | A "paret" = to spermatogonier (mus) |
| A _s | A "singel" = en spermatogonie (mus) |
| A _{dark} | A "mørk", brukt om spermatogonier i mennesket |
| A _{pale} | A "blek", brukt om spermatogonier i mennesket |
| ANOVA | Variansanalyse |
| AP-sete | Apurin/apyrimidin sete = baseløs sete |
| B[a]P | Benso[a]pyren |
| BER | Baseeksisjonsreperasjon |
| BPDE | Benso[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoksid |
| BSA | Bovint serum albumin |
| BTB | Blod-testikkelbarrieren |
| C | Cytosin |
| Cu/Zn SOD | Cu/Zn superoksid dismutase |

| | |
|----------------|--|
| DMSO | Dimetyl sulfoksid |
| DNA | Deoksyribonukleinsyre |
| DSB | Dobbeltråddbrudd |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Etylendinitrilotetraeddiksyre |
| FCS | Føtalt kalveserum |
| FEN1 | Flap endonuclease 1 |
| Fpg | Formamidopyrimidin DNA-glykosylase |
| FSH | Follikelstimulerende hormon |
| G | Guanin |
| G:C | Guanin:Cytosin |
| GDNF | Gliacellelinjederivert nevrotrofisk faktor |
| IVC | Individuelt ventilerte bur |
| LH | Luteiniserende hormon |
| LigI | DNA ligase I |
| LigIII | DNA ligase III |
| LP | Flernukleotid baseeksisjonsreparasjon (long patch) |

| | |
|-----------------------|--|
| MMS | Methyl Metansulfonat |
| MutM | Formamidopyrimidin DNA-glykosylase |
| MutY | Adenin DNA-glykosylase (<i>E.coli</i>) |
| MutYH | Adenin DNA-glykosylase (pattedyr) |
| NER | Nukleotideksisjonsreparasjon |
| NHEJ | Non-homologous end-joining = ikke-homolog sammensveising |
| Nth1 | Tymin glykol DNA-glykosylase |
| Ogg1 | 8-oksoguanin DNA-glykosylase |
| PI | Propidium iodid |
| P/S | Penicillin/streptomycin |
| PAH | Polysykliske aromatiske hydrokarboner |
| PBS | Dulbecco's fosfatbufret saltvann |
| PCNA | "Proliferating Cell Nuclear Antigen" |
| Pol β | DNA polymerase β |
| Pol δ/ϵ | DNA polymerase delta/epsilon |
| RFC | Replikasjonsfaktor C |
| Ro 12-9786 | Etyl 7-okso-7h-tieno[2,3-A]-quinolisin-8-karboksylat |

| | |
|-----------|--|
| ROS | Reaktive oksygenforbindelser |
| SOD | Superoksid dismutase |
| SPR | Enkeltnukleotid baseeksisjonsreparasjon (short patch) |
| SSB | Enkelttrådbrudd |
| T | Tymin |
| T:A | Tymin:Adenin |
| TE-buffer | TrisEDTA-buffer |
| TDS | Testikulært feilutviklingssyndrom |
| UDS | Ikke-cellesynkron DNA-syntese = DNA reparasjonsassosiert DNA-syntese |
| UV | Ultrafiolett(UV)-stråling |
| XRCC1 | Røntgen krysskomplementerende protein 1 |
| WT | Villtype |

Innhold

| | |
|--|-----------|
| Forord | I |
| Oppsummering | II |
| Summary | IV |
| Forkortelser | VI |
| 1. Introduksjon | 1 |
| 1.1 Generell bakgrunn | 1 |
| 1.2 Mannlige kjønnsceller | 2 |
| 1.2.1 Testikkelens fysiologi og anatomi | 2 |
| 1.2.2 Spermatogenesisen | 4 |
| 1.2.3 Spermatogonier | 6 |
| 1.2.4 Sertoliceller | 9 |
| 1.3 DNA-skader | 10 |
| 1.3.1 Oksidative DNA-skader | 11 |
| 1.3.2 Oksidasjon av guanin | 12 |
| 1.4 Reparasjon av DNA-skader | 13 |
| 1.4.1 Baseeksisjonsreparasjon (BER) | 14 |
| 1.5 DNA-reparasjon i testikkelceller | 15 |
| 1.5.1 Spermatogonier | 18 |
| 1.5.2 Sertoliceller | 19 |
| 1.5.3 Mulige konsekvenser av DNA-skade i testikkelceller | 19 |
| 1.6 Sentrale metoder | 20 |
| 1.6.1 Induksjon av 8-oksoG og deteksjon av DNA-skadenivå med kometmetoden | 20 |
| 1.7 Mål | 21 |
| 2. Materiale og metode | 22 |
| 2.1 Eksperimentell design | 22 |
| 2.2 Mus | 23 |
| 2.2.1 Avl | 23 |
| 2.2.2 Avlivning og disseksjon av testikler | 23 |
| 2.3 Enzymatisk isolering av testikkelceller fra neonatale mus | 23 |
| 2.4 Seleksjon av spermatogonier og somatiske celler | 24 |
| 2.5 Immunocytokjemi | 25 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 2.5.1 | Fiksering av celler | 26 |
| 2.5.1.1 | Fiksering og permabilisering med etanol | 26 |
| 2.5.1.2 | Fiksering med 0,1 % PFA..... | 26 |
| 2.5.1.3 | Fiksering med 2 % PFA..... | 26 |
| 2.5.2 | Farging med antistoffer | 26 |
| 2.5.2.1 | Anti-vimentin..... | 26 |
| 2.5.2.2 | Cu/Zn SOD | 27 |
| 2.5.2.3 | Prosedyre | 27 |
| 2.6 | Celletelling og tester av celleintegritet | 28 |
| 2.6.1 | Celletelling | 28 |
| 2.6.2 | Trypanblå eksklusjonstest..... | 28 |
| 2.6.3 | Propidiumiodid eksklusjonstest | 29 |
| 2.7 | Induksjon av oksidativ DNA-skade | 29 |
| 2.7.1 | <i>In vitro</i> eksponering for Ro 12-9786 og synlig lys | 30 |
| 2.8 | DNA-reparasjon..... | 30 |
| 2.8.1 | Kometmetoden..... | 30 |
| 2.8.2 | Analyse av DNA-skader..... | 32 |
| 2.9 | Tilleggseksperiment – effekt av O ₂ -miljø på reparasjonskapasitet | 33 |
| 2.10 | Statistiske metoder..... | 33 |
| 2.10.1 | Biologiske og tekniske replikater..... | 33 |
| 2.10.2 | Fremstilling av data..... | 34 |
| 2.10.3 | Statistisk analyse av kometdata | 34 |
| 3. | Resultater | 36 |
| 3.1 | Isolasjon og seleksjon av testikkelceller fra neonatale mus..... | 36 |
| 3.1.1 | Fiksering og farging med antistoffer | 36 |
| 3.1.2 | Anrikning av spermatogonier | 36 |
| 3.2 | Cu/Zn superoksid dismutase (SOD) i testikkelceller | 37 |
| 3.3 | Celleintegritet..... | 38 |
| 3.3.1 | Trypanblå- og PI-eksklusjonstest – test for cellemembranintegritet | 38 |
| 3.3.2 | Bakgrunnsnivå av DNA-skade i kometmetoden..... | 39 |
| 3.4 | Induksjon og reparasjon av oksidative DNA-skader | 39 |
| 3.5 | Reparasjonskapasitet ved redusert oksygen..... | 44 |
| 4. | Diskusjon | 48 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.1 | Induksjon av oksidativ DNA-skade og reparasjonskapasitet | 49 |
| 4.1.1 | Induksjon og reparasjon av DNA-skader i spermatogonier | 49 |
| 4.1.2 | Induksjon og reparasjon av DNA-skader i umodne sertoliceller | 50 |
| 4.1.3 | Har spermatogonier mer effektiv reparasjon enn støttecellene? | 51 |
| 4.2 | Uttrykk av antioksidantenzymet Cu/Zn SOD i testikkelceller | 52 |
| 4.3 | Trives testikkelceller best i miljøer med redusert oksygen? | 53 |
| 4.4 | Metodiske betraktninger | 54 |
| 4.4.1 | Celleintegritet | 55 |
| 4.4.2 | Isolering av celler | 55 |
| 4.4.3 | Anrikning av spermatogonier og sertoliceller | 56 |
| 4.4.4 | Karakterisering av spermatogonier og sertoliceller | 57 |
| 4.5 | Konklusjoner | 57 |
| 4.6 | Videre arbeid | 58 |
| | Referanseliste | 60 |
| | Vedlegg A | 69 |
| | Vedlegg B | 70 |
| | Vedlegg C | 72 |

1. Introduksjon

1.1 Generell bakgrunn

Mannens helse i relasjon til reproduksjon har fått mye oppmerksomhet de siste tiårene. I dag har hvert syvende par utfordringer med å få barn. Til tross for at fokus historisk sett har vært på kvinnens fertilitet, er problemene relatert til mannen i halvparten av tilfellene (Singh *et al.*, 2011). Redusert spermkvalitet og stadig flere tilfeller av testikkelkreft er blant flere observasjoner som gir grunnlag for bekymring for mannens helse.

Ann-Karin Olsen og kollegaer ved Folkehelseinstituttet er blant forskerne som foreslår miljøeksponeringer som en av årsakene til den observerte reduserte fertiliteten hos menn. Røyking er godt dokumentert blant faktorene som gir økte nivåer av DNA-skader i sperm. Oksidativ DNA-skade, blant annet den spesifikke skaden 8-okso-7,8-dihydroguanin (8-oksoG) er vist å være tilstede i sperm. En nedgang i antall spermceller og spermkvaliteten er positivt korrelert med 8-oksoG-lesjoner i cellene (Ni *et al.*, 1997; Zitzmann *et al.*, 2003). Stadig flere observasjoner i kliniske og epidemiologiske studier foreslår en økt insidens av mannlige reproduksjonsproblemer (Borg *et al.*, 2010). Det er vist at sannsynligheten for å lykkes med assistert befruktning reduseres med inntil 40 % hvis mannen røyker (Zitzmann *et al.*, 2003). Infertile menn har høyere nivå av DNA-skade i spermcellene enn fertile menn, men til tross for signifikant DNA-skade i spermcellen opprettholdes evnen til å fertilisere en eggcelle (Ahmadi og Ng, 1999). Genetisk skade kan dermed overføres til avkom og medføre endringer i fosterets utvikling, tidlige aborter og mer sykdom hos avkommet (Ahmadi og Ng, 1999). Barn av fedre som røyker har i tillegg økt risiko for kreft i barneårene (Boffetta *et al.*, 2000; Cordier, 2008; Ji *et al.*, 1997).

Det er estimert at en fertil mann produserer opptil 1000 spermceller for hvert hjerteslag i gjerne seksti år eller mer. En så omfattende prosess som spermatogenesis krever åpenbart en robust og velkontrollert stamcellepopulasjon (Griswold og Oatley, 2012). Eksponering for fremmedstoffer i miljøet kan være en av flere årsaker til genetiske skader i mannens kjønnsceller, enten i stamcellene eller i mer differensierte kjønnsceller i ulike stadier i spermatogenesis. Forstyrrelse i spermatogenesis kan skje på mange stadier, enten under proliferering av støttceller eller stamceller, under differensieringen mot en moden spermcelle eller direkte på mekanismene som skal regulere prosessen. Arvelige sykdommer, kreft og aldring kan medføre slike forstyrrelser. Videre kan medisiner, hormonell ubalanse, røntgenstråling fra en medisinsk undersøkelse eller noe så enkelt som økt temperatur påvirke spermatogenesis i negativ retning. Effekten av alle disse faktorene kan være redusert fekunditet (evne til å lage barn), enten i form av redusert antall modne spermier, muterte spermier, forstyrrelser under meiosen eller apoptose (programmert celledød) av spermatogonier eller differensierte kjønnsceller. Til tross

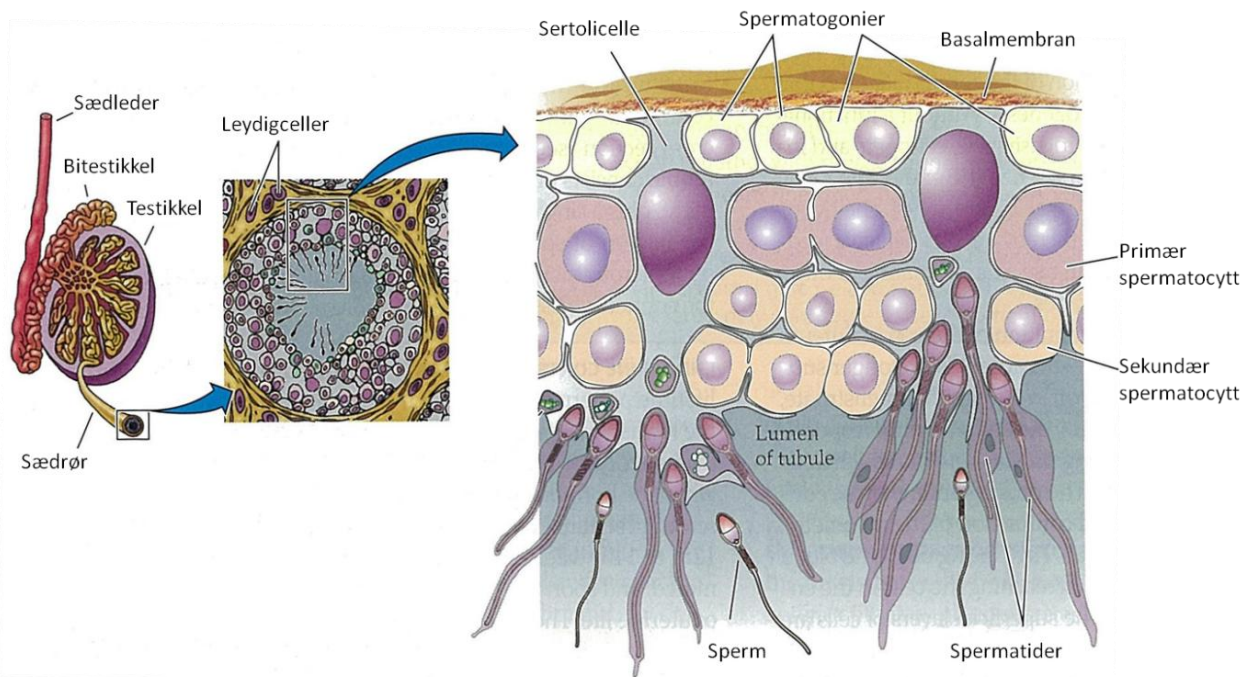
for effektene, kan spermatogenesis gjenopptas dersom stamcellespermatogoniene overlever (Holstein *et al.*, 2003).

Det finnes mye kunnskap om somatiske cellers respons på DNA-skade og etter hvert også i kjønnsceller. DNA-skader kan fjernes via DNA-reparasjon og kapasiteten til å reparere DNA-skader i differensierte kjønnsceller er klart lavere enn somatiske celler. Meiose og spermatogenese innebærer en rekke endringer som påvirker både struktur og funksjonell organisering av genomet og det tettpakkede DNA-et kan gjøre at tilgangen for reparasjonsproteiner er dårlig. Det kan dessuten være for risikabelt å prøve å reparere eventuelle skader (Olsen *et al.*, 2005). Lite er kjent om DNA-reparasjon i spermatogonier og spesielt stamcellene i testikkelen. Dette er til dels fordi de har vært vanskelige å studere på grunn av lavt antall testikkelceller i nyfødte gnagere, og svært lavt relativt antall spermatogonier i kjønnsmodne dyr, i tillegg til kompleksiteten til stamcellenisjen. En av hovedutfordringene har vært å utvikle en solid protokoll for å isolere og dyrke spermatogoniale stamceller. Dette målet skal vi tilnærme oss i denne masteroppgaven. Ved å studere mekanismene som er involvert i å ta hånd om induserte DNA-skader i mannlige kjønnsceller, spesielt i spermatogoniale stamceller, kan man lettere forstå skadevirkningene på kjønnsceller hos både mennesker og dyr, og dermed også mulige konsekvenser for avkom. Bedre kunnskap om stamcellene i testikkelen kan på sikt benyttes til å forstå reproduksjonsproblemer med målsettingen å forbedre mannens fertilitet.

1.2 Mannlige kjønnsceller

1.2.1 Testikkelens fysiologi og anatomi

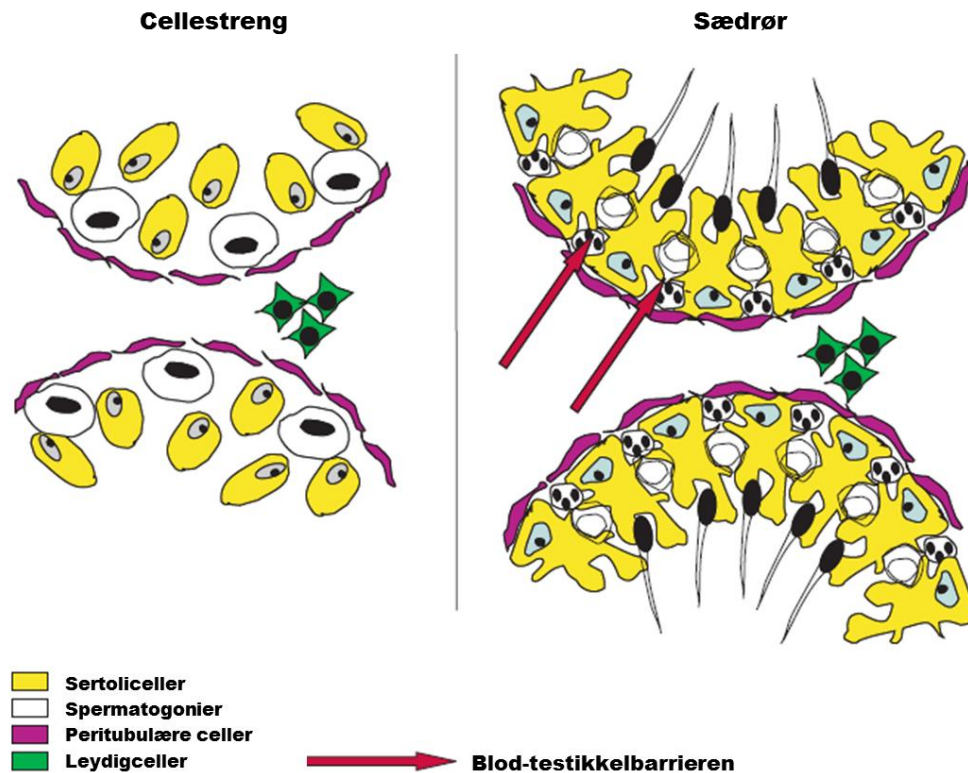
Testikkelen er den delen av hannens reproduksjonsorgan som produserer spermceller og hormonet testosteron (Petersen og Soder, 2006). Testikkelen er omsluttet av en bindevevskapsel (*tunica albuginea*) og består av to hoveddeler, de oppkveilede sædrørene (*tubuli seminiferi contorti*) og vevet mellom sædrørene, den intertubulære delen (figur 1.1). Den intertubulære delen inneholder blant annet leydigceller, blodårer og makrofager. Leydigcellene produserer det mannlige kjønnsormonet testosteron, som er nødvendig både for mannlig differensiering av fosteret og spermproduksjon senere i livet. Sædrørene er formet som løkker med to ender som fører inn i et nettverk av kanaler (*rete testis*). Herfra føres kjønnscellene til bitestikkelen (*epididymis*) og videre til sædlederen (*vas deferens*) (Hill *et al.*, 2008).



Figur 1.1 Testikkelens oppbygning og struktur. Bildet til høyre viser et tverrsnitt av et sædrør fra basalmembranen (ytterst) til lumen (innerst). Mer informasjon om de ulike stadiene av kjønnsceller er i avsnitt 1.2.2. Modifisert fra Hill *et al.* (Hill *et al.*, 2008).

Sædrørene inneholder kjønnsceller og støtteceller (sertoliceller). Sædrørene deles inn i en basal del og en adluminal del av såkalte tette forbindelser (tight junctions) mellom sertolicellene som er en viktig del av blod-testikkelbarrieren (Petersen og Soder, 2006; Russell *et al.*, 1990). Barrierens funksjon er å opprettholde et unikt miljø rundt de differensierende kjønnscellene og beskytter i tillegg kjønnscellene mot en rekke skadelige stoffer og immunologisk angrep (Petersen og Soder, 2006; Russell *et al.*, 1990). Den basale delen av sædrørene er en intim stamcellenisje hvor spermatogonier har direkte kontakt med sertoliceller og med basalmembranen. Primære spermatocytter penetrerer inn i lumen gjennom blod-testikkelbarrieren.

Sædrørene utvikles fra celledstrenger ("seminiferous cords") når sertolicellene begynner og produsere seminiferøs væske og lumen dannes ved dag 12 etter fødselen i mus (Drumond *et al.*, 2011; Petersen og Soder, 2006). De umodne sædrørene (cellestrengene) består kun av umodne sertoliceller, peritubulære somatiske celler og primære kjønnsceller; spermatogonier (Petersen og Soder, 2006), som vist i figur 1.2.





Figur 1.2 Cellestreng (umodent sædrør) i neonatale (nyfødte) dyr og sædrør i kjønnsmodne dyr. Inne i cellestrengene er det kun umodne, aktivt delende sertoliceller og spermatogonier i ulike stadier. Dannelsen av lumen definerer overgangen fra cellestreng til sædrør og deretter dannes blod-testikkelbarrieren som består av tette forbindelser mellom modne sertoliceller. Meiotiske og postmeiotiske kjønnsceller befinner seg innenfor blod-testikkelbarrieren. Modifisert fra Petersen og Söder (Petersen og Soder, 2006).

Partialtrykket av O_2 i testikkelen er veldig lavt i forhold til andre vev (Free *et al.*, 1976; Klotz *et al.*, 1996; Reyes *et al.*, 2012). Temperaturen er lavere i testikkelen enn i resten av kroppen, noe som delvis forklarer de lave partialtrykkene av oksygen i skrotale pattedyr, da temperaturen påvirker partialtrykket av en gass. Blodårene går ikke inn i sædrørene og oksygen må diffundere inn til lumen av sædrøret. Kjønnscellene i testikkelen er derfor antatt å være eksponert for enda lavere partialtrykk enn celler i interstitielt vev siden de er lengst borte fra kapillærene. Det er noe uklart hva det faktiske partialtrykket av oksygen i sædrøret er, men det interstitielle partialtrykket i testikkelen er omtrent 20 % av partialtrykket i arteriene i testikkelen (oversiktsartikkel av (Reyes *et al.*, 2012)). Oksygendistribusjonen til testikkelen er bestemt av blodåresystemet i testikkelen, men tilgangen til oksygen for kjønnscellene er bestemt hovedsakelig av oksygendiffusjon fra blodårene og inn i sædrørene (Reyes *et al.*, 2012).

1.2.2 Spermatogenesisen

Spermatogenesisen er en komplisert og strengt regulert prosess som deles inn i tre ulike stadier: den mitotiske, proliferative fasen (spermatogoniegenesen), meiosen og spermiogenesen (de Rooij, 1998; Holstein *et al.*, 2003). Spermatogenesisen tar like lang tid hver gang i en bestemt art. I mennesker tar det omtrent 64 dager for en

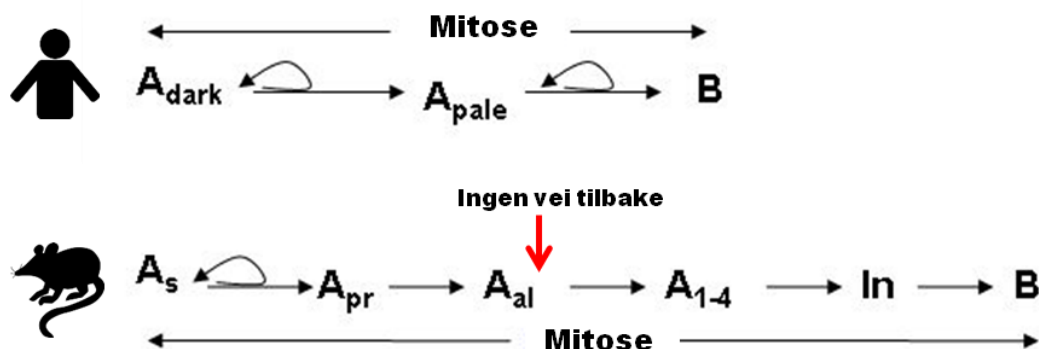
kjønnscele å utvikle seg fra differensierte spermatogonier til modne spermceller, i mus tar samme prosess 35 dager (Marchetti og Wyrobek, 2005) (figur 1.3).

| Testikkel | | | | | | Bitestikkel |
|---|----------------|----------------|-------------|------------|---------|-------------|
| Mitose | | Meiose | | Postmeiose | Modning | |
| Stamceller | Spermatogonier | Spermatocytter | Spermatider | Sperm | | |
| DNA-syntese | | | | | | |
|  | 100 | 64 | 38 | 25 | 15 | 0 dager |
|  | 45 | 35 | 21 | 14 | 7 | 0 dager |

Figur 1.3 Skjematisk tidsperspektiv for spermatogenesisen i pattedyr. Varighet for hvert stadiet i spermatogenesisen er angitt for mennesker (øverst) og mus (nederst) i forhold til aktuell fertiliseringsdag (ved 0 dager). Stadier med DNA-syntese er markert. Modifisert fra Marchetti og Wyrobek (Marchetti og Wyrobek, 2005).

Produksjon av modne spermceller under spermatogenesisen krever kontinuerlig fornyelse og differensiering av kjønnsceller. Det proliferative stadiet sørger for fornyelse når spermatogoniale stamceller og spermatogonier gjennomgår mitotiske delinger i den basale delen av sædrøret. Ved fødselen kalles kjønnscellene for gonocytter og de er lokalisert i midten av de umodne sædrørene. Disse vil flytte seg til basalmembranen etter fødselen (McGuinness og Orth, 1992) og gjennomgå flere endringer (Drumond *et al.*, 2011) før de gir opphav til stamcellespermatogonier (de Rooij og Russell, 2000). Forståelsen for utvikling av gonocytter til spermatogonier er ikke helt klar, da noen forskere (Huckins og Clermont, 1968) mener at gonocytterne utvikles til intermediære pre-spermatogonier, mens andre forskere mener at gonocytter utvikles til to typer celler, enten spermatogoniale stamceller eller til differensierte spermatogonier (Kluin og de Rooij, 1981; Yoshida *et al.*, 2006). Basert på observasjoner i gnagere kalles stamcellespermatogonier i pattedyr A single(A_s) spermatogonier, som er isolerte enkeltceller (se figur 1.4). Disse kan enten fornye seg og gi oppgav til nye A_s eller differensiere mot en spermcelle (de Rooij, 1998; de Rooij og Russell, 2000; Singh *et al.*, 2011). A_s celler kan dele seg ved mitose og gi oppgav til A paret og A "aligned" (A_p og A_{al}) celler, hvor A_p er to celler bundet sammen og A_{al} er rekker på fire, åtte, 16 eller 32 celler. A_{al} og A_{pr} er fremdeles såkalte udifferensierte spermatogonier. Når A_{al} celler differensierer er det ingen vei tilbake, og deretter følger seks mitotiske delinger (A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , intermediær type og type B spermatogonier), som vist i figur 1.4.

Mennesket har langt færre mitotiske celledelinger fra den spermatogoniale stamcellen til spermatogonier type B enn gnagere som beskrevet ovenfor (Singh *et al.*, 2011). Mens gnagere har åtte mitotiske delinger før spermatogonie type B entrer meiosestadiet har mennesket kun to (figur 1.4). Det medfører blant annet en lavere produksjon av modne kjønnsceller per stamcelle i testikkelen hos mennesket sammenliknet med gnagere. Spermatogonie type A_s i gnagere tilsvarer type A_{dark} (mørk) i mennesket og spermatogonier type A_{pr} og A_{al} i mus tilsvarer menneskets A_{pale} (blek) spermatogonier (Singh *et al.*, 2011).



Figur 1.4 Mitosefasen av spermatogenesisen i menneske og mus. Mus har åtte mitotiske delinger av spermatogonier før meiosefasen i motsetning til menneske som kun har to. Det medfører at hver forløpercelle hos mus gir opphav til en større andel modne spermceller. Modifisert fra Singh *et al.* (Singh *et al.*, 2011).

Type B spermatogonier markerer starten på meiosen og gir opphav til primære spermatocytter. Meiosen og spermiogenesisen foregår på innsiden av blod-testikkelbarrieren. Spermatocytene deles i stadiene preleptoten-, leptoten-, zygoten- og pachyten primære spermatocytter og sekundære spermatocytter. De primære spermatocytene gjennomgår første meiotiske celledeling og gir opphav til sekundære spermatocytter, som gjennomgår andre meiosedeling og gir opphav til haploide spermatider. Den meiotiske fasen reduserer kromosomtallet til det halve ($1N$) før cellene inntar den haploide fasen, spermiogenesisen. Denne siste fasen karakteriseres av at cellene gjennomgår en rekke morfologiske endringer delt inn i 16 stadier (Oakberg, 1956) og inntar den unike strukturen til en moden mannlig kjønnscelle. Deretter kan spermcellene frigjøres inn i lumen av sædrøret og bevege seg gjennom bitestikkelen og gi opphav til moden sperm (spermatozoa) som kan fertilisere eggcellen (Sutovsky og Manandhar, 2006).

1.2.3 Spermatogonier

Mens noen spermatogonier opprettholder den spermatogoniale cellepopulasjonen ved å produsere differensierende kjønnsceller, er andre i hvilefasen av cellyklusen (Griswold og Oatley, 2012). Spermatogonier klassifiseres som differensierte og udifferensierte, hvor de udifferensierte er enten stamcellespermatogonier eller proliferative spermatogonier. De siste årene har det vært debatt rundt studier (oppsummert i (de Rooij, 2009; de Rooij og Griswold, 2012; Griswold og Oatley, 2012)) som har foreslått at de udifferensierte spermatogoniene (A_s , A_{pr} , A_{al}) er en heterogen cellepopulasjon med mulighet både til selvfornyng og differensiering etter behov. Det medfører at A_{al} og A_{pr} kan bli stamceller etter store tap av spermatogonier som følge av f.eks. toksiske effekter fra miljøkemikalier (de Rooij, 2009). Det betyr at de fleste udifferensierte spermatogonier kan bli stamceller når de plasseres i riktig nisje (Singh *et al.*, 2011). Dersom alle understadier av udifferensierte spermatogonier har kapasitet til å regenerere spermatogenesisen, er systemet mer fleksibelt enn lenge

antatt (Griswold og Oatley, 2012). I tillegg er det foreslått at ikke alle A_s spermatogonier er ekte stamceller, og det er behov for flere studier for å finne ut hvilke spermatogonier som faktisk er stamceller og hvilke som har potensiale til å bli stamceller (oppsummert i (de Rooij og Griswold, 2012)).

En stamcellenisje kan defineres som et område i et vev hvor stamcellene befinner seg gjennom hele livet (de Rooij, 2009). Cellemiljøet i nisjen vil promotere stamcellefornyelse, mens stamceller som forlater nisjen sannsynligvis vil komme til et miljø som promoterer differensiering (de Rooij, 2009). I testikkelen hos pattedyr er stamcellenisjen bestående av sertoliceller, basalmembran, peritubulære myoidceller og stimuli fra blodårenettverket mellom sædrørene. Interaksjoner mellom kjønnsceller og sertoliceller muliggjør en funksjonell spermatogenese (Singh *et al.*, 2011). Flere studier (Chiarini-Garcia *et al.*, 2003; Chiarini-Garcia og Russell, 2001; Yoshida *et al.*, 2007) viser til at stamcellenisjen ikke er distribuert tilfeldig langs basalmembranen, men i spesifikke områder hvor basalmembranen grenser til interstitielt vev og ikke til basalmembranen i nærliggende sædrør. Udifferensierte spermatogonier (A_s , A_{pr} , A_{ai}) er funnet i store mengder i disse områdene, og funnene forslår at stamcellenisjen er assosiert med blodårenettverket i det interstitielle vevet (oppsummert i (Griswold og Oatley, 2012)). Denne organiseringen kan forklares med at cellene i stamcellenisjen mottar signaler fra komponenter i interstitielt vev. Blodbårne faktorer kan ha direkte effekt på stamceller eller sertolicellen som igjen signaliserer til stamcellene om de skal produsere faktorer for selvfornyning eller differensiering. Det kompliserte samspillet kan illustreres med testosteronproduksjonen. Denne reguleres via hypotalamus-hypofyse-gonade (HPG)-aksen hvor luteiniserende hormon (LH) stimulerer leydigcellene til å produsere og frigjøre testosteron i interstitielt vev (de Rooij, 2009; Sutovsky og Manandhar, 2006). Follikkelstimulerende hormon (FSH) stimulerer sertolicellene til å produsere androgenbindende reseptorer (AR), en type reseptorer som ikke er tilstede i kjønnscellene. AR er nødvendig for å binde testosteron, som er en forutsetning for meiose og utvikling av spermatocytter til modne spermceller (Petersen og Soder, 2006; Sutovsky og Manandhar, 2006).

Spermatogoniale stamceller utgjør kun 0,02 % av alle kjønnsceller hos kjønnsmodne gnagere (Tegelenbosch og de Rooij, 1993), fordi de gir opphav til så høyt antall differensierte spermatogonier, spermatocytter, spermatider og sperm. Den lave andelen av spermatogoniale stamceller er en av utfordringene for å kunne studere disse cellene. Åtte dager gamle mus har det samme totale antallet udifferensierte A type spermatogonier som kjønnsmodne dyr, og dermed høyere relativ konsentrasjon av disse. Ti-tolv dager gamle mus har 30-50 millioner udifferensierte spermatogonier pr gram testikkelvev mot 1,9 millioner pr gram testikkelvev i kjønnsmoden mus (Drumond *et al.*, 2011). Det er videre estimert at det er 35 000 stamceller i hver musetestikkel og omtrent 330 000 udifferensierte spermatogonier (Singh *et al.*, 2011).

Det er gjort morfologiske undersøkelser i mus for å følge utviklingen av kjønnsceller hver dag etter fødselen (Drumond *et al.*, 2011). Kun gonocytter ble funnet i de

umodne sædrørene (cellestrenger) ved fødselen og en dag etter fødselen (tabell 1.1). To dager etter fødselen var udifferensierte spermatogonier (A_s , A_p , A_{ai}) til stede, og på tredje og fjerde dag var spermatogonier opptil type A4 observert. På dag fem og seks etter fødsel var alle typer spermatogonier til og med type B til stede i cellestrengene. De første primære spermatocytterne var til stede på dag åtte, senere stadier av primære spermatocytter på dag ti og sekundære spermatocytter ble observert 20 dager etter fødselen. De aller første elongerte spermatidene ble observert i små mengder 27 dager etter fødselen og etter 37 dager var første runde av spermatogenesen gjennomført. Ved å avlive hannmus fem til syv dager etter fødsel kan man på grunn av tidsperspektivet anta at kjønnscellene som isoleres fra testikkelen er spermatogonier, siden differensieringen til primære spermatocytter starter ved dag åtte.

Tabell 1.1 Ulike stadier av kjønnsceller til stede i testikkelen hos mus etter fødsel. Modifisert fra Drumond *et al.* (Drumond *et al.*, 2011).

| Dager etter fødsel, mus | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5* | 6* | 8 | 10 | 12 | 17 | 20 | 27 | 37 |
|--------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gonocytter undertype I | III | III | I | | | | | | | | | | | |
| Gonocytter undertype II | III | III | II | | | | | | | | | | | |
| Gonocytter undertype III | II | II | III | II | I | | | | | | | | | |
| Udifferensierte spermatogonier | | | II | III | III | III | III | III | II | II | II | II | II | II |
| Spermatogonier A_1 | | | I | III | III | III | III | III | III | III | III | III | III | III |
| Spermatogonier A_2 | | | | II | III | III | III | III | III | III | III | III | III | III |
| Spermatogonier A_3 | | | | I | II | III | III | III | III | III | III | III | III | III |
| Spermatogonier A_4 | | | | I | I | II | III | III | III | III | III | III | III | III |
| Intermediære spermatogonier | | | | | | I | II | III | III | III | III | III | III | III |
| Type B spermatogonier | | | | | | I | I | II | II | III | III | III | III | III |
| Primære spermatocytter | | | | | | | | I | I | II | III | III | III | III |
| Sekundære spermatocytter | | | | | | | | | | | | I | III | III |
| Runde spermatider | | | | | | | | | | | | | III | III |
| Elongerte spermatider | | | | | | | | | | | | | I | III |

I (få celler), II (intermediær mengde celler), III (normal mengde celler, som i en kjønnsmoden mus).

* Tidsperiode aktuell for denne oppgaven. Mus avlives ved dag 5-7 fordi primære spermatocytter er til stede ved dag åtte.

Drumond og kollegaer (Drumond *et al.*, 2011) fant videre at den eneste morfologiske forskjellen mellom en spesifikk spermatogonietype i en seks dager gammel mus og en kjønnsmoden (70 dager) mus, var diameteren på kjernen som var større i yngre enn i kjønnsmodne dyr. De spermatogoniale undertypene og de mer differensierte cellene hadde lik organisering i sædrørene som det man ser i de ulike stadiene hos kjønnsmodne mus. Drumond og kollegaer konkluderte med at den spermatogoniale organiseringen (syklus) er regulert allerede før sertolicellene blir modne (Joyce *et al.*, 1993; Vergouwen *et al.*, 1991). Videre ble det funnet at den spermatogoniale celledifferensieringen foregår raskere i yngre dyr, delvis fordi den spermatogoniale fasen er akselerert (Drumond *et al.*, 2011).

1.2.4 Sertoliceller

Sertoliceller ble beskrevet allerede i 1865 av Enrico Sertoli som støtteceller for kjønnscellene på alle trinn av spermatogenesen (Petersen og Soder, 2006). Forvandlingen fra en umoden, prolifererende sertolicelle til en moden, ikke-prolifererende sertolicelle er betydelig. Sertolicellens morfologi og biokjemiske aktivitet er helt forskjellig i den føtale og kjønnsmodne testikkelen. Det er noe uklart om overgangen fra føtal til moden sertolicelle består av flere trinn eller et rask skifte (Sharpe *et al.*, 2003), men overgangen inntreffer ved starten av puberteten (Kluin *et al.*, 1984; Russell *et al.*, 1990; Sharpe *et al.*, 2003) omtrent to uker etter fødselen i gnagere. Sertolicellens rolle i den føtale perioden har vært å utvikle en funksjonell testikkel og sørge for seksuell differensiering av den mannlige fenotype (Petersen og Soder, 2006). Den føtale sertolicellen muliggjør dannelsen av de oppkveilede sædrørene og differensiering av leydigcellene (Petersen og Soder, 2006; Sharpe *et al.*, 2003; Tarulli *et al.*, 2012). Sertolicellenes struktur i den kjønnsmodne testikkelen illustrerer deres mange funksjoner. På basalmembranen som omgir sædrøret ligger sertolicellene i tett kontakt med kjønnsceller på forskjellige utviklingstrinn. De modne sertolicellene fungerer som støtteceller for kjønnscellene, de omdanner blant annet produkter fra det vaskulære systemet til laktat og leverer denne energikilden direkte til kjønnscellene i lumen. Hver sertolicelle i mennesket har kapasitet til å støtte fire-fem kjønnsceller i ulike stadier og definerer derfor testikkelstørrelsen og det totale antallet kjønnsceller (Orth *et al.*, 1988; Petersen og Soder, 2006; Sharpe *et al.*, 2003). Hos gnagere kan sertolicellen støtte opptil 12 kjønnsceller (Holstein *et al.*, 2003). Hver sertolicelle ligger inntil flere andre sertoliceller og under modningen dannes tette forbindelser mellom cellene når den første runden av spermatogenese kommer i gang ved inngangen til puberteten (Sharpe *et al.*, 2003).

Det tradisjonelle synet på den modne sertolicellepopulasjonen har vært at den er relativt stabil helt fra sertolicellene slutter å dele seg ved inngangen til puberteten (Auharek og de Franca, 2010; Kluin *et al.*, 1984; Petersen og Soder, 2006; Russell *et al.*, 1990). Antall sertoliceller er dermed bestemt ved inngangen til voksenlivet, siden det kun er umodne sertoliceller som deler seg. De siste årene er dette synet på sertoliceller utfordret av en rekke studier (oversiktsartikkel av Tarulli *et al.* (Tarulli *et*

al., 2012)). Det er blant annet vist *in vitro* at sertoliceller har evne til å gjenoppta cellesyklus og celledeling (Ahmed *et al.*, 2009).

Sertoliceller sender eksterne signaler for å opprettholde spermatogenesisen (Griswold, 1998) og sørger for fornyelse av spermatogoniale stamceller ved å produsere vekstfaktoren gliacellelinjederivert nevrotrofisk faktor (GDNF) (Hofmann, 2008). Den kontinuerlig høye produksjonen av nye kjønnsceller og differensiering mot spermatozoa krever en kvalitetskontroll, apoptose (Sinha Hikim og Swerdloff, 1999). Sertoliceller kan sende to typer signaler for å indusere apoptose i kjønnsceller, enten ved å øke (pro)apoptotiske faktorer eller ved å redusere (pro)overlevelsesfaktorer. Boekelheide og kollegaer (Boekelheide *et al.*, 2000) illustrerer forholdet mellom testikkelcellene som todelt, de samme cellene som støtter og gir næring til kjønnscellene, kan også gi dødssignaler. Kanatsu-Shinohara og kollegaer (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2005) har påvist sertolicellenes rolle for kjønnselledifferensiering ved å transplantere normale sertoliceller i testikkelen til infertile dyr som hadde defekte sertoliceller, som resulterte i gjenopptatt spermatogenese og fertilitet.

Etter hvert som fokus økte på forstyrrelser i mannens reproduksjon refererte Skakkebaek og kollegaer (Skakkebaek *et al.*, 2001) til testikulært feilutviklingssyndrom (TDS). Syndromet inkluderer en rekke tilstander som var vist å øke i flere land, blant annet redusert spermantall og testikkelkreft. Forstyrrelser i utviklingen av sertoliceller tidlig i livet, for eksempel at modning ikke forekommer, kan bidra til disse forstyrrelsene i testikkelens funksjon, og er involvert i reduksjon av spermkvaliteten og testikkelkreft (Petersen og Soder, 2006). Ufullstendig utviklede sertoliceller som har morfologiske karakteristika som umodne celler har blitt observert i testikler fra mennesket i tilfeller med kryptorkisme, testikkelkreft og dysfunksjonell spermatogenese (Sharpe *et al.*, 2003). Det er foreslått at miljøkjemikalier, som for eksempel eksponering for hormonforstyrrende stoffer tidlig i livet kan bidra til økning i TDS (Skakkebaek *et al.*, 2001).

1.3 DNA-skader

Hver eneste dag induseres omtrent 10 000 DNA-lesjoner i hver somatiske celle pga naturlige prosesser (Hoeijmakers, 2001). DNA-molekylet er sårbart for endringer i temperatur og pH, feil under replikasjonen eller spontane endringer som oppstår ved hydrolyse og oksidering. Som følge av spontan hydrolyse *in vivo* forekommer et signifikant antall enkeltrådbrudd og tap av baser i alle somatiske celler. Den største endogene trusselen er reaktive oksygenforbindelser som er biprodukter fra cellens egen metabolisme. I tillegg kan DNA-skade oppstå som følge av eksponering for en rekke eksogene samt via endogene prosesser (De Bont og Van Larebeke, 2004). Eksogene agens inkluderer mange miljøfaktorer som genotoksiske kjemikalier, UV-stråling, røntgenstråling og tungmetaller. Toksiner kan være tilstede i alt fra bileksos og sigaretttrøyk til mat. Slike eksogene agens kan endre den kjemiske strukturen til DNA og indusere ulike typer skade.

DNA-molekylet kan skades på en rekke måter; det kan dannes enkelt - og dobbeltråddbrudd, kryssbindinger, og kovalent binding av metabolitter til DNA-baser, kalt DNA-addukter. Av alle typer DNA-skader er dobbeltråddbrudd den største trusselen mot genomets integritet. Kjemiske endringer av DNA-basene og suktermolekylet forekommer hyppig, som for eksempel oksiderte baser eller apurine/apyrimidine (AP)-seter. Gjennom evolusjonen er et utstrakt og ofte overlappende nettverk av mekanismer for å reparere skadet DNA ofte godt konserverert i prokaryoter og eukaryoter. Dette synliggjør hvor viktig det er å korrigere en DNA-skade. Takket være disse DNA-reparasjonsmekanismene er sannsynligheten for at en DNA-skade får konsekvenser lav. DNA-skader som ikke repareres kan ha en rekke effekter som inhibering av transkripsjon og/eller replikasjon eller celledød. Om DNA-skaden ikke korrigeres før DNA-molekylet gjennomgår replikasjon er det betydelig risiko for at skadene konverteres til mutasjoner som medvirker til aldring, kreft og andre sykdommer (De Bont og Van Larebeke, 2004; Hoeijmakers, 2001). I hvilende somatiske celler, som f.eks. modne sertoliceller, vil DNA-skade på enkeltcellen sannsynligvis ikke medføre mutasjoner siden cellepopulasjonen ikke gjennomgår replikasjon. Det samme gjelder sent differensierte kjønnsceller. I tidlige stadier av kjønnsceller er bekymringen for mutasjoner stor, siden replikasjon av skadet DNA kan medføre mutasjoner i alle cellene forløpercellen gir opphav til.

1.3.1 Oksidative DNA-skader

Fokus i denne oppgaven er reparasjon av oksidative DNA-skader i testikkelceller. Den naturlige metabolismen i levende celler gir opphav til reaktive oksygenforbindelser (ROS), som for eksempel singlet oksygen ($^1\text{O}_2$), superoksidradikaler ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hydrogenperoksid (H_2O_2) og hydroksylradikaler (OH^{\cdot}) (De Bont og Van Larebeke, 2004). At elektrontransportkjeden lekker elektroner til oksygenatomer er hovedårsaken til intracellulære ROS (Cooke *et al.*, 2003). Siden de reaktive oksygenforbindelsene alltid er til stede i cellen de også den vanligste årsaken til oksidativ DNA-skade. I tillegg kan ROS dannes av eksponering for eksogene agens inkludert kjemikalier (f.eks. tungmetaller som kadmium og bly), ioniserende stråling og UV-stråling (Cooke *et al.*, 2003). Livsstilsfaktorer som sigarettøyk, alkohol og høyt fettinnhold i kostholdet kan også øke produksjonen av ROS (Wilson *et al.*, 2003).

For at de reaktive oksygenforbindelsene skal være skadelige, må det i midlertidig dannes oksidativt stress ved at produksjonen av ROS og den naturlige forsvarsmekanismen i cellene kommer i ubalanse (De Bont og Van Larebeke, 2004). Ved overskudd av ROS kan forbindelsene oksidere både proteiner, lipider og DNA. Cellens første forsvar mot ROS består av en rekke antioksidanter, som f.eks. vitamin C og vitamin E, samt detoksifiserende enzymer som glutathion peroksidase, katalase og superoksid dismutase (Evans *et al.*, 2004; Lieberman *et al.*, 2009). Superoksid dismutase (SOD) er en gruppe antioksidantenzymmer som er svært viktige i cellene for å beskytte mot oksidativt stress (Celino *et al.*, 2011; Valko *et al.*, 2006).

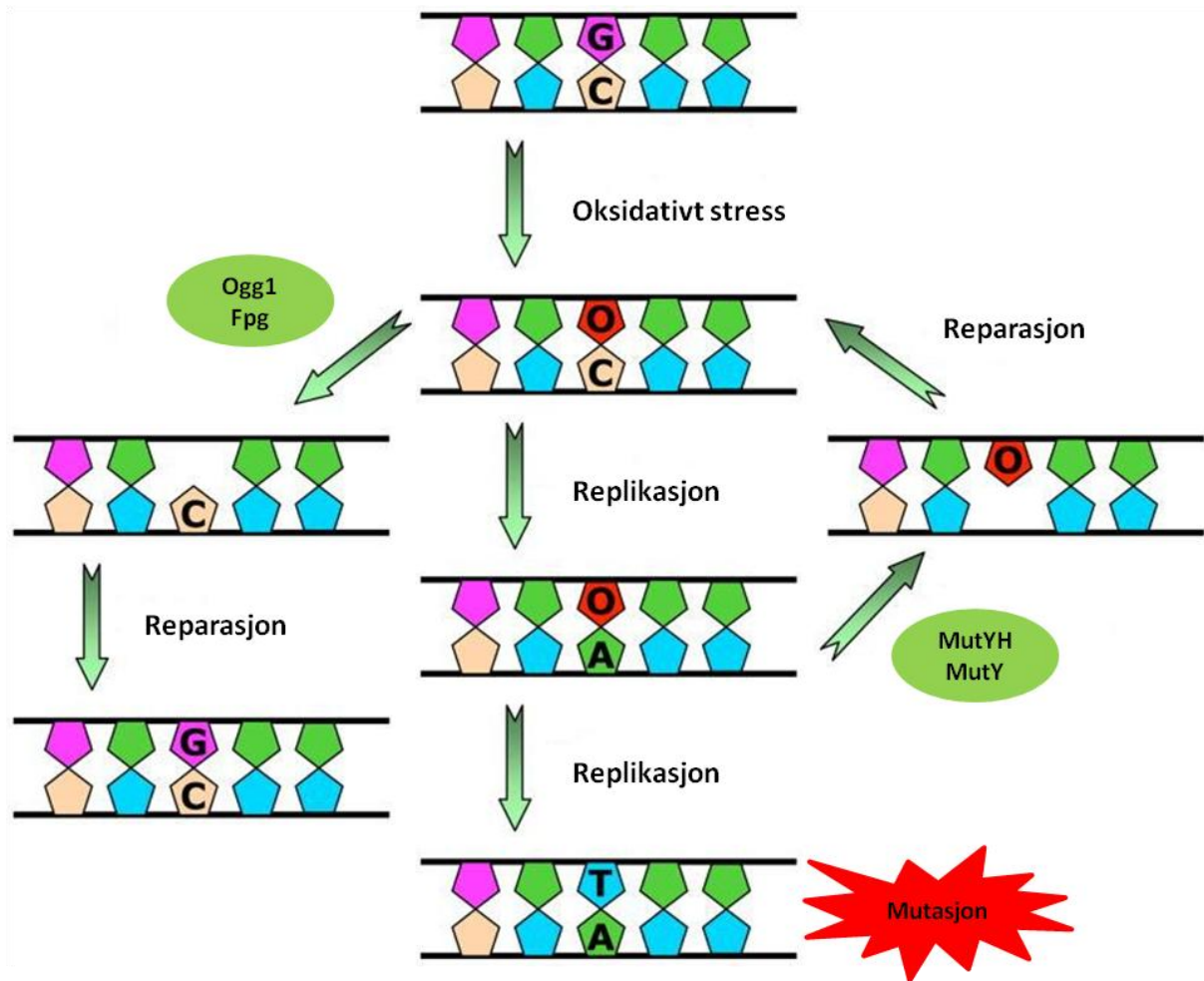
Antioksidantaktiviteten til SOD ble påvist for første gang av McCord og Fridovich i 1969 (McCord og Fridovich, 1969). Det finnes flere ulike grupper SOD som katalyserer dismutasjon av det svært reaktive superoksidradikalet til oksygen og hydrogenperoksid ($2 \text{O}_2^- + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$). En av disse gruppene, Cu/Zn SOD, regnes for å være det primære antioksidantforsvaret som katalyserer dismutasjon av superoksidradikalet til oksygen og vann (Valko *et al.*, 2006). Dette er svært viktig, siden superoksidradikalet i tillegg til å gi direkte skade på makromolekyler, også genererer andre ROS (Lieberman *et al.*, 2009). Hydroksylradikalet er den mest aktive forbindelsen i angrep mot biologiske molekyler og kan genereres fra superoksid via Fenton-reaksjonen ved tilstedeværelse av Fe^{2+} eller Cu^+ , samt fra hydrogenperoksid via Haber-Weiss-reaksjonen (Lieberman *et al.*, 2009).

Det er vist at oksidativt stress induserer inflammasjon og at det er oksidativt stress til stede under utvikling av sykdommer som kreft og nevrodegenererende sykdommer som Alzheimers og Parkinsons, men det er få studier som beskriver påvirkningen av oksidativ stress på spermatogenesen (Celino *et al.*, 2012; Cooke *et al.*, 2003; Evans *et al.*, 2004).

1.3.2 Oksidasjon av guanin

Ved oksidering av DNA kan blant annet AP-seter med påfølgende DNA-trådbrudd i alle de fire DNA-basene (adenin, guanin, cytosin, tymin) oppstå (De Bont og Van Larebeke, 2004). Guanin er den av basene som har lavest oksygenpotensial og er derfor mest sårbar for oksidering. Et hydroksylradikal kan binde seg til C-8 i guanin og oksidere radikalet slik at en av de vanligste oksidative guaninlesjonene dannes; 8-okso-7,8-dihydroguanin (8-oksoG) (Cooke *et al.*, 2003; David *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2003), se figur 1.5. Tilstedeværelsen av 8-oksoG brukes som en biomarkør for oksidativt stress i celler (David *et al.*, 2007).

I motsetning til mange andre DNA-skader vil 8-oksoG ofte overses av DNA polymeraser. 8-oksoG kan funksjonelt likne på en T (David *et al.*, 2007) og baseparer lett med både adenin og cytosin (Cooke *et al.*, 2003). 8-oksoG kan danne et stabilt Watson-Crick basepar med cytosin, som kan repareres av Formamidopyrimidine DNA-glykosylase (Fpg) fra *Escherichia coli* (*E. Coli*), eller 8-oksoguanin DNA-glykosylase (Ogg1), som er den funksjonelle homologen til Fpg i pattedyr. Dersom 8-oksoG danner misparring med adenin oppstår det et stabilt oksoG:A basepar som etter neste runde replikasjon blir en T:A transversjonmutasjon, dersom ikke adenin fjernes av adenin DNA-glykosylasene MutYH/MutY, som vist i figur 1.5. G:C→T:A mutasjoner er en av de vanligste mutasjonene assosiert med kreft (Cooke *et al.*, 2003).



Figur 1.5 Oksidasjon av guanin til 8-oksoG i DNA kan føre til G:C→T:A transversjonmutasjoner. Ved oksidasjon av guanin (G) som følge av oksidativt stress dannes 8-oksoG (O). DNA-glykosylasene Ogg1/Fpg gjenkjenner og fjerner 8-oksoG fra cytosin (C) slik at det baseløse setet kan prosesseres av andre enzymer i BER. Ved baseparring mellom 8-oksoG og adenin (A) kan DNA-glykosylasene MutYH/MutY fjerne den feilinkorporerte adeninbasen. Dersom 8-oksoG ikke repareres kan replikasjon av DNA medføre en G:C → T:A tranversjonmutasjon. Modifisert fra David *et al.* (David *et al.*, 2007).

1.4 Reparasjon av DNA-skader

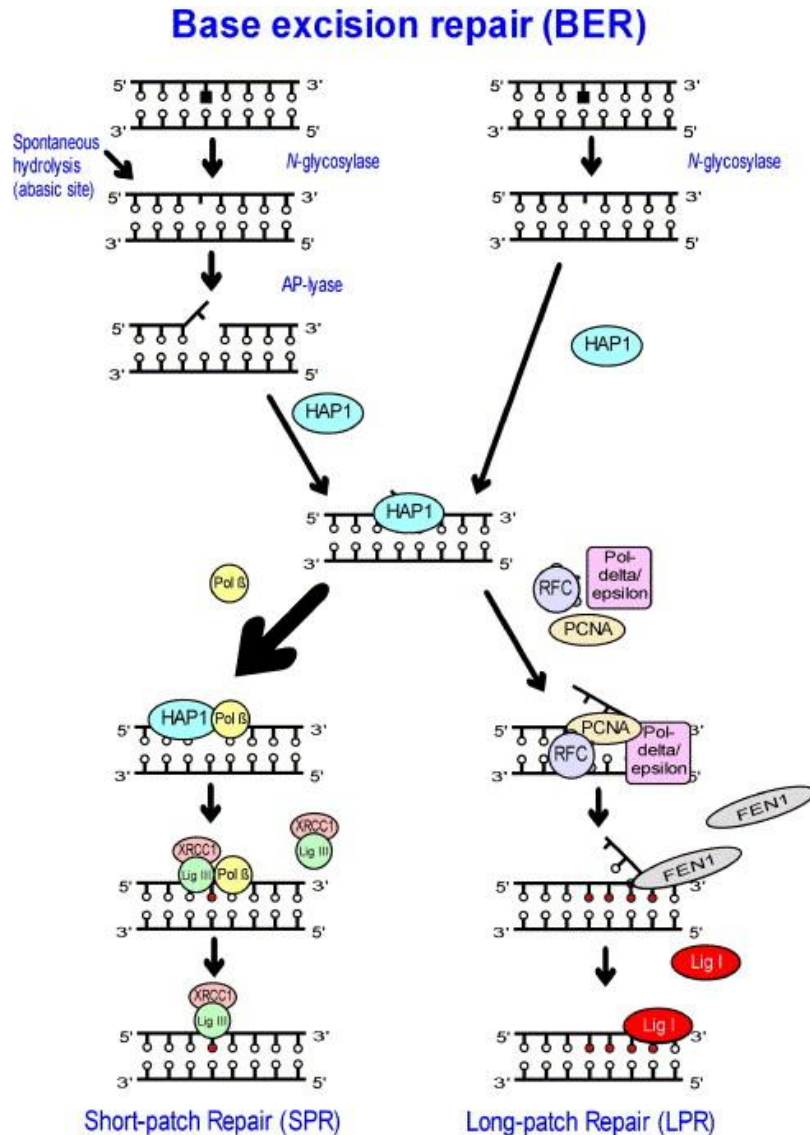
Celler har vanligvis et robust forsvar mot skade på arvestoffet. Førstelinjeforsvaret forsøker å hindre at DNA-skader oppstår. Detoksifiserende proteiner og antioksidanter som vitamin C kan ufarliggjøre potensielt skadende stoffer. Dersom skaden på arvestoffet allerede har oppstått, kan et bredt spekter av reparasjonsmekanismer igangsettes, avhengig av hvilken skade som er tilstede. Et siste alternativ er at cellen ofrer seg selv fremfor hele organismen, og gjennomfører apoptose for å forhindre opphopning av mutasjoner (Hoeijmakers, 2001; Olsen *et al.*, 2005).

Celler har utviklet flere reparasjonsmekanismer for å forhindre at skade på arvematerialet skal opprettholdes. Hvert reparasjonssystem gjenkjenner en spesiell type skade som den er ekspert på og reparere. Ulike reparasjonssystemer er blant annet direkte reparasjon, feilparringsreparasjon (mismatch),

rekombinasjonsreparasjon og eksisjonsreparasjon (Hoeijmakers, 2001). Felles for eksisjonsreparasjoner er at en eller flere skadde baser klippes ut og erstattes med nye. Spesifikke skadde baser kan enten fjernes alene via baseeksisjonsreparasjon (BER) eller som en del av et større fragment via nukleotideksisjonsreparasjon (NER) hvor flere nukleotider på begge sider av den faktiske skaden inkluderes. DNA-addukter forårsaket av UV-lys eller kjemikalier fjernes hovedsakelig via NER, mens mindre skader på baser og sukker fjernes hovedsakelig ved BER (Hoeijmakers, 2001; Zharkov, 2008). Oksidative DNA-skader reparerer hovedsakelig av BER ved DNA glykosylaser som fjerner oksiderte baser eller ved NER som involverer fjerning av flere nukleotider.

1.4.1 Baseeksisjonsreparasjon (BER)

Thomas Lindahl (1974) var den første til å rapportere at BER intiteres ved at DNA-glykosylaser frigjør skadde baser (figur 1.6) (Lindahl, 1974). Et eksempel på reparasjon via BER er allerede omtalt i kapittel 1.3.2. Generelt kan mekanismen beskrives ved at en rekke DNA-glykosylaser gjenkjenner og kutter skadde baser. DNA-glykosylasene katalyserer hydrolyse av bindingen mellom sukkermolekylet og basen, slik at det dannes baseløse seter. Deretter følger kutting av fosfodiesterbinding slik at enkelttrådbrudd oppstår, resyntese av den skadde basen og liggering av snittet med en DNA-polymerase. Reparasjonsproteinene som er inkludert i BER er vist i figur 1.6 og forklares mer detaljert i Olsen *et al.* (Olsen *et al.*, 2005). BER er delt inn i enkeltnukleotid (short-patch) reparasjon og flernukleotid (long-patch) reparasjon, hvor det er henholdsvis 1 eller 2-10 nukleotider som byttes (Olsen *et al.*, 2005; Zharkov, 2008).



Figur 1.6 Baseeksisjonsreparasjon (BER) via enkelt nukleotid (short-patch) og flernukleotid (long-patch) reparasjon. Forkortelser er henholdsvis: HAP1, human AP-endonuklease 1; Polβ, DNA polymeraseβ; XRCC1, Røntgen krysskomplementerende protein 1; LigIII, DNA ligase III; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; RFC, replikasjonsfaktor C; Polδ/ε, DNA polymerase delta/epsilon; FEN1, Flap endonuklease; LigI, DNA ligase 1. Modifisert av Olsen *et al.* (Olsen *et al.*, 2005) fra Ide og Kotera (Ide og Kotera, 2004).

1.5 DNA-reparasjon i testikkelceller

Evne til å korrigere DNA-skader (DNA-reparasjon) forhindrer induksjon av mutasjoner. Den spontane mutasjonsfrekvensen i kjønnsceller er lavere enn i somatiske celler, og den synker med utviklingstrinnene i hannens kjønnsceller (Walter *et al.*, 1998). Den lave spontane mutasjonsfrekvensen i spermatogonier type A kan komme av at kjønnscellene er relativt beskyttet gjennom utviklingen. Mutasjonsfrekvensen synker gjennom stadiene av spermatogenesen i unge mus, og Walter og kollegaer har foreslått at det finnes en form for kvalitetskontroll i premeiotiske stadier som gjør at kun celler med spesielt lav mutasjonsfrekvens får fortsette til meiose (Walter *et al.*, 1998). Dette samsvarer med den massive

apoptotiske eliminasjonen av celler fra type A til type B spermatogoniestadiet og særlig i den første meiotiske runden (Mori *et al.*, 1997). Aktiv reparasjon av DNA skader som forekommer spontant, slik som oksiderte baser, vil redusere risiko for at DNA skader fikseres som mutasjoner. Man kan derfor tenke seg at spermatogonier har effektiv DNA-reparasjon, men kjennskap til DNA-reparasjon i spermatogonier er svært begrenset.

BER er en viktig reparasjonsmekanisme for å opprettholde genomets integritet i somatiske celler og kjønnsceller og er forventet å være aktiv og effektiv i alle stadier av spermatogenesen som kommer tidligere enn elongerte spermatider hos både gnagere og mennesket (Olsen *et al.*, 2001). Dette viste seg og ikke å være tilfelle for alle typer DNA skader som elimineres via BER, og samtidig ble betydelige forskjeller mellom arter påvist hvor mennesket har begrenset reparasjonskapasitet av visse DNA skader (Olsen *et al.*, 2005). Celler i ulike stadier av spermatogenesen viser forskjellig aktivitet av de ulike reparasjonsmekanismene. Elongerte spermatider har ikke reparasjon av DNA-skader, men testikkelceller (fra gnagere) i tidligere stadier av spermatogenesen reparerer enkelttrådbrudd like effektivt som somatiske celler (Olsen *et al.*, 2001; Van Loon *et al.*, 1991; Van Loon *et al.*, 1993). Det er flere observasjoner som tilsier at BER aktiviteten er høy i kjønnsceller i forhold til somatiske celler, blant annet er det høyere reparasjonskapasitet for DNA-skader induert av et metylerende agens (methyl-metansulfonat (MMS) (Olsen *et al.*, 2001) eller oksiderte pyrimidiner (Olsen *et al.*, 2003; Olsen *et al.*, 2005). Videre er det høyere nivå av uracil-DNA glykosylase (UDG)-initiert BER aktivitet i kjønnsceller enn i somatiske celler (Intano *et al.*, 2001). Metylert DNA blir effektivt reparert av testikkelceller fra både rotte og menneske (Olsen *et al.*, 2001). Siden både primære spermatocytter og runde spermatider viste effektiv reparasjon, foreslo forfatterne at BER er effektiv under hele spermatogenesen. Olsen og kollegaer (Olsen *et al.*, 2003) presenterte senere overraskende resultater hvor testikkelceller fra mennesket viste svært ineffektiv reparasjon av Fpg-sensitive skader induert (8-oksoG), som hovedsakelig reparerer via BER, mens rotter viste effektiv reparasjon av samme skade. I samme studie viste de at reparasjon av oksiderte pyrimidiner (Nth-sensitive lesjoner) var effektiv i testikkelceller fra både rotte og menneske. Humane testikkelceller kan dermed være spesielt sensitive for oksidasjon av puriner (8-oksoG), selv om de har velfungerende BER av andre DNA skader.

Oksidative DNA-skader elimineres ikke utelukkende via BER, det er overlapp mellom mekanismene, noe som kan antyde viktigheten av å eliminere DNA-skader. Det er vist at NER i meiotiske- og postmeiotiske kjønnsceller er redusert i forhold til aktiviteten i somatiske celler og flere studier rapporterer inaktiv NER i testikkelceller hos mennesket (Brunborg *et al.*, 1995; Jansen *et al.*, 2001; Olsen *et al.*, 2010), men det kan se ut til at aktiviteten av NER er avhengig av hvilken DNA-skade som skal elimineres. Studier (Olsen *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2005) viser til at NER-aktiviteten varierer mellom de ulike stadiene i spermatogenesen hos gnagere. BaP induserer BPDE-DNA-addukter i testikkelceller som reparerer hovedsakelig via NER. Olsen og

kollegaer (Olsen *et al.*, 2010) viste at adduktene ikke ble eliminert i de senere stadiene av spermatogenesisen i mus. BPDE-addukter ble funnet i sperm differensiert fra BaP-eksponerte spermatocytter, men sperm differensiert fra BaP-eksponerte spermatogonier hadde ingen påvisbare DNA-addukter. Om dette kunne tilskrives DNA-reparasjon, apoptose eller rett og slett fortynning av DNA-addukter som følge av proliferasjon er uvisst (Olsen *et al.*, 2010). Til tross for at det ikke ble funnet addukter i sperm differensiert fra BaP-eksponerte spermatogonier, ble det vist at eksponeringen ga opphav til *de novo* mutasjoner i spermcellene som kan overføres til avkom (Olsen *et al.*, 2010). Xu og kollegaer (Xu *et al.*, 2005) foreslår at alle postmeiotiske celler (spermatider og spermatocytter) i mus har redusert NER aktivitet. Ved å eksponere ulike stadier av kjønnsceller for UVB-stråling, viste spermatogonier type A og B lavere overlevelse etter bestråling og høyere NER-aktivitet enn mer differensierte kjønnsceller. En større andel av spermatocytene, spermatidene og de somatiske kontrollcellene (keratinocytene) enn spermatogoniene var levedyktige en viss tid etter eksponeringen. Mest aktiv reparasjon viste de somatiske kontrollcellene, keratinocytene. Forfatterne foreslo at redusert aktivitet av NER i kjønnsceller kan forklares med at skader som vanligvis repareres via NER hindrer replikasjon og transkripsjon og at cellene ikke vil dele seg med denne type DNA-skader i genomet. Siden antallet kjønnsceller er så høyt elimineres heller cellene via apoptose enn å bruke ressurser på DNA-reparasjon. I andre stamcelletyper enn stam- og premeiotiske celletyper i testikkelen er det vist at embryonale stamceller (ES) har mer effektiv reparasjon av uracil enn embryonale fibroblaster (MEF) (Tichy *et al.*, 2011) og at humane embryonale stamceller har mer effektiv reparasjon enn humane primære fibroblaster av en rekke DNA-skader, foruten de påført av UV-C (Maynard *et al.*, 2008).

Siden de mannlige kjønnscellene er en svært heterogen cellepopulasjon er det ikke overraskende at uttrykk og funksjon av DNA-reparasjon er forskjellige i de ulike cellene. Hvor sårbare celler er for DNA-skade fra miljøeksponeringer og hvordan de reparerer skaden kan variere i henhold til hvor cellen er i celledyklusen, og i tillegg hvordan kromatinstrukturen i cellen er. Kromatinstrukturen endrer seg betydelig gjennom spermatogenesisen, med histonbundet DNA i stadiene fra spermatogonier til runde spermatider, til tettpakket DNA i modne spermier (som har protaminbundet DNA og inaktiv transkripsjon). I spermatider blir kromatinet så tettpakket at det er sannsynlig at både induksjon og reparasjon av DNA-skade påvirkes. Olsen *et al.* (Olsen *et al.*, 2010) så kun små forskjeller mellom indusert skade i spermatocytter og runde spermatider, men elongerte spermatider (mer tettpakket DNA) så ut til å ha lav reparasjon av Fpg-sensitive skader, noe som er foreslått å være relatert til kromatinstruktur.

Mannlige kjønnsceller går ikke gjennom celledeling på samme måte som somatiske celler. Enhver DNA-skade som induseres etter den siste runden replikasjon (preleptoten spermatocytt) vil ikke fikseres som mutasjon før etter fertilisering, forutenom via såkalt ikke feilfri (error-prone) DNA-reparasjon. For arten kan det

derfor være en fordel å eliminere celler ved apoptose i stedet for å reparere for å hindre mutasjoner. Denne teorien støttes av det massive tapet av kjønnsceller gjennom spermatogeneseprosessen. Funksjonell spermatogenese forutsetter eliminering av mannlige kjønnsceller i form av apoptose. Apoptose foregår spontant under normale forhold og øker ofte ved kjemikalieindusert skade i testikkelen (Forand *et al.*, 2009). Mekanismene bak apoptose er ikke helt forstått, men apoptose av skadde premeiotiske kjønnsceller (spermatogonier) kan være kritisk i beskyttelsen av senere generasjoner fra effekter fra ulike eksponeringer (Forand *et al.*, 2009). Spontan apoptose skjer fordi sertolicellene kun kan støtte et visst antall kjønnsceller.

1.5.1 Spermatogonier

En komplett eliminering av stamcellene i testikkelen vil medføre irreversibelt tap av mannlige kjønnsceller (Russell *et al.*, 1990). Allerede for førti år siden ble det vist at stamcellespermatogonier er relativt resistente mot røntgenstråling og overlever ofte når differensierte spermatogonier dør (Dym og Clermont, 1970; Huckins, 1978; Huckins og Oakberg, 1978). Det ble videre demonstrert i gnagere at intermediære og type B spermatogonier er svært sensitive for stråling, mens type A spermatogonier er en heterogen populasjon; majoriteten dør ved moderate doser røntgenstråling, mens noen overlever svært høye doser. De overlevende cellene er de som var i hvilefasen. De uddifferensierte, proliferative spermatogoniene samt de differensierte spermatogoniene har en svært høy mitotisk rate i forhold til hvilende stamceller og kan derfor være mer sårbare for agens som påvirker spermatogenesen pga cellesyklusfasen.

DNA-skade i spermatogonier er lite undersøkt i motsetning til senere stadier av kjønnsceller. Tidligere studier av mus viste at etter en periode med varmestress, som kan medføre oksidativt stress (Paul *et al.*, 2009), ble spermatogonier sjelden apoptotiske, mens mange av de meiotiske og postmeiotiske kjønnscellene ble apoptotiske (Paul *et al.*, 2008). Selv om årsaken til observasjonene ikke er avklart, indikerte resultatene at meiotiske og postmeiotiske kjønnsceller er mer sensitive for ROS. Celino og kollegaer (Celino *et al.*, 2011) påviste at Cu/Zn SOD er høyt uttrykt i testikulære spermatogonier hos japansk ål, men mindre uttrykt i differensierte kjønnsceller. Studiet foreslår at antioksidantforsvaret er ulikt i de forskjellige stadiene under spermatogenesen. Videre viser de at nivået av Zn i cellen synker når kjønnscellene utvikler seg mot spermatozoa. Med disse resultatene foreslår Celino *et al.* (Celino *et al.*, 2011) at spermatogonier gjennom evolusjonen kan ha utviklet en sterk beskyttelsemekanisme mot DNA-skade, med tanke på at de befinner seg på utsiden av blod-testikkelbarrieren og er mer utsatt for ROS angrep.

Det er først de siste årene at *in vivo* respons på genotoksisk stress er blitt karakterisert i spermatogonier (Forand *et al.*, 2009; Rube *et al.*, 2011). Forand og kollegaer eksponerte neonatale mus for ioniserende stråling og analyserte responsen i gonocytter (dag 1 etter fødsel), spermatogonier (dag 8 etter fødsel) og prolifererende somatiske testikkelceller (dag 1 etter fødsel). Spermatogonier og gonocytter var langt mer sensitive enn somatiske testikkelceller for induksjon av

dobbeltråddbrudd. De neonatale kjønnscellene har høye nivåer av mRNA for proteiner involvert i reparasjon av dobbeltråddbrudd. De fant videre at de neonatale kjønnscellene ofte ble apoptotiske etter bestråling. Forand og kollegaer foreslo at de høye basalnivåene av reparasjonsproteiner beskytter arvestoffet under fysiologiske forhold, men at celler eksponert for genotoksisk stress elimineres ved apoptose.

Etter høy stråledose i kjønnsmodne mus er det vist at stamcellespermatogonier ikke uttrykker reparasjonsproteiner som er vanlige i somatiske celler (fra annet vev enn testikkelvev) (Rube *et al.*, 2011). Resultatene viste at mekanismene for reparasjon av dobbeltråddbrudd i DNA i spermatogonier er klart forskjellig fra den i somatiske celler. Forfatterne foreslår derfor at alternative former for reparasjonsmekanismer av typen end-joining foregår i stamcellene. Det blir også vist at effektive cellesyklussjekkpunkter i differensierende spermatogonier vil eliminere celler ved apoptose som respons på genotoksisk stress, men ikke stamcellene selv.

1.5.2 Sertoliceller

Sertoliceller skiller seg fra andre ikke-delende (fase G0) somatiske celler ved at de uttrykker DNA reparasjonsproteiner og cellesyklusregulerende proteiner. Dette underbygger at sertolicellen ikke har mistet evnen til proliferering (oversiktsartikkel av Tarulli *et al.* (Tarulli *et al.*, 2012)). Sertoliceller fra kjønnsmoden mus og mennesker er vist å gjenoppta proliferering og reparerer dobbeltråddbrudd etter eksponering for røntgenstråling *in vitro* (Ahmed *et al.*, 2009). Hvilken reparasjonsmekanisme som blir benyttet i sertolicellene er imidlertid ikke klart.

1.5.3 Mulige konsekvenser av DNA-skade i testikkelceller

Dersom en spermatogonie ikke reparerer oksidert guanin før cellen deler seg kan det medføre en G:C→T:A transversjonmutasjon, som vist i figur 1.5. Dette medfører *de novo* mutasjoner i spermcellen som kan videreføres til avkom. At meiotiske og post-meiotiske humane testikkelceller (spermatocytter, spermatider) har svært lav reparasjonskapasitet for 8-oksoG kan medføre redusert fekunditet og økt risiko for induksjon av *de novo* mutasjoner etter fertilisering.

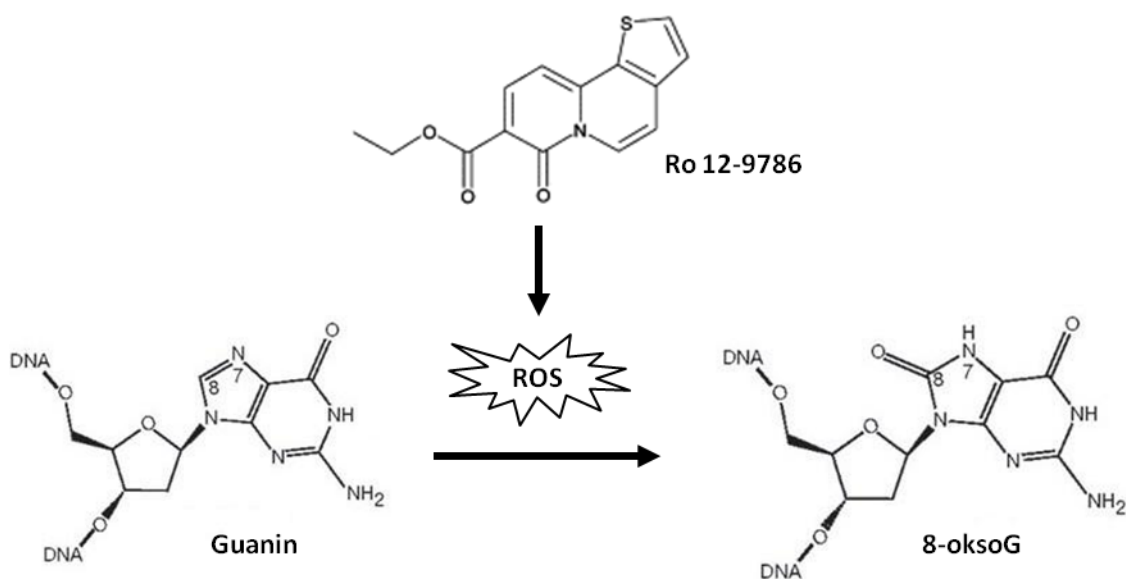
Det er større bekymring for mutasjoner i spermatogonier enn i differensierte kjønnsceller. DNA-skader i spermatogoniestamceller kan medføre økt antall mutasjoner i avkommet. DNA-skade i spermatocytter og spermatider reduserer fertiliteten midlertidig, men DNA skadene i spermen har potensiale til å uttrykkes som mutasjoner etter fertilisering.

Vi har ikke kjennskap til publiserte studier vedrørende reparasjon av 8-oksoG i sertoliceller. DNA-skade på de somatiske cellene (sertoli – og leydigceller) i testikkelen kan gi store konsekvenser i likhet med DNA-skade på kjønnscellene. Indirekte effekt av DNA-skade i sertoliceller kan være forstyrrelser eller stopp i spermatogenesisen, som reduserer mannens fertilitet, eller i verste fall, sterilitet (Sharpe *et al.*, 2003).

1.6 Sentrale metoder

1.6.1 Induksjon av 8-oksoG og deteksjon av DNA-skadenivå med kometmetoden

Under utvikling av medisiner blir mange forbindelser forkastet fordi det oppdages at de har mutagene egenskaper (Gocke *et al.*, 2003; Will *et al.*, 1999). En slik forbindelse, Ro 12-9786, ble påvist å indukere spesifikk oksidativ baseskade når forbindelsen ble belyst med synlig lys. I ettertid har forbindelsen blitt benyttet i eksperimentelle systemer på grunn av sin evne til å eksitere av synlig lys. Når fotosensitive forbindelser slik som Ro 12-9786 bestråles med synlig lys under oksygenrike forhold vil Ro 12-9786 produsere store mengder superoksidradikaler (Gocke *et al.*, 2003), som igjen vil generere reaktive oksygenforbindelser i form av hydroksylradikaler (se figur 1.7). Hydroksylradikalene induserer oksiderte baser som for eksempel 8-oksoG. Ro 12-9786 induserer et lavt antall enkeltråddrudd (Schneider *et al.*, 1990), som er en fordel siden reparasjon av enkeltråddrudd skjer raskt og kan forstyrre reparasjonen av oksidativ skade.



Figur 1.7 Reaktive oksygenforbindelser (ROS) reagerer med DNA-basen guanin og danner 8-okso-7,8-dihydroguanin (8-oksoG). Det fotosensitiserende kjemikaliert Ro 12-9786 frigjør superoksidradikaler ($O_2^{\cdot-}$) ved belysning, som genererer andre typer ROS, blant annet hydroksylradikaler (OH^{\cdot}). Hydroksylradikalet oksiderer guanin og danner 8-oksoG. Modifisert fra Gocke *et al.* (Gocke *et al.*, 2003) og Hsu *et al.* (Hsu *et al.*, 2004).

Ved å indukere en spesifikk skade kan reparasjonen av denne studeres ved bruk av kometmetoden. I kometmetoden detekteres enkeltråddrudd og alkalilabile seter og en reduksjon i antall detekterte skader over tid vil indikere reparasjon. For å gjøre metoden mer sensitiv inkluderes spesifikke enzymer, som f.eks. Fpg som gjenkjenner blant annet den oksidative DNA-skaden 8-oksoG. DNA glykosylasene

kutter DNA-tråden i setet ved skaden og gjør at de spesifikke DNA-skadene kan bli gjenkjent i kometmetoden (Collins *et al.*, 2008; Olsen *et al.*, 2003). Prinsippet og prosedyren for kometmetoden er beskrevet ytterligere i kapittel 2.8.1.

1.7 Mål

Hovedmålet for denne oppgaven er å bidra til god reproduktiv helse, ved å avklare mekanismer som har betydning for DNA-skader i testikkelceller. Økt kunnskap om testikulære spermatogonier (deriblant stamceller) og støttceller (sertoliceller) i neonatale dyr vil bidra til dette målet. Særlig ønsker vi å se på hvordan celletypene tolererer oksidativ DNA-skade som oppstår etter eksponering for en rekke miljøkjemikalier og cellenes evne til å eliminere slike DNA-skader. Testikkelcellene i neonatale dyr er spesielt interessante fordi deres mottakelighet og respons på DNA-skader kan gi konsekvenser for resten av mannens fertile liv.

Delmål

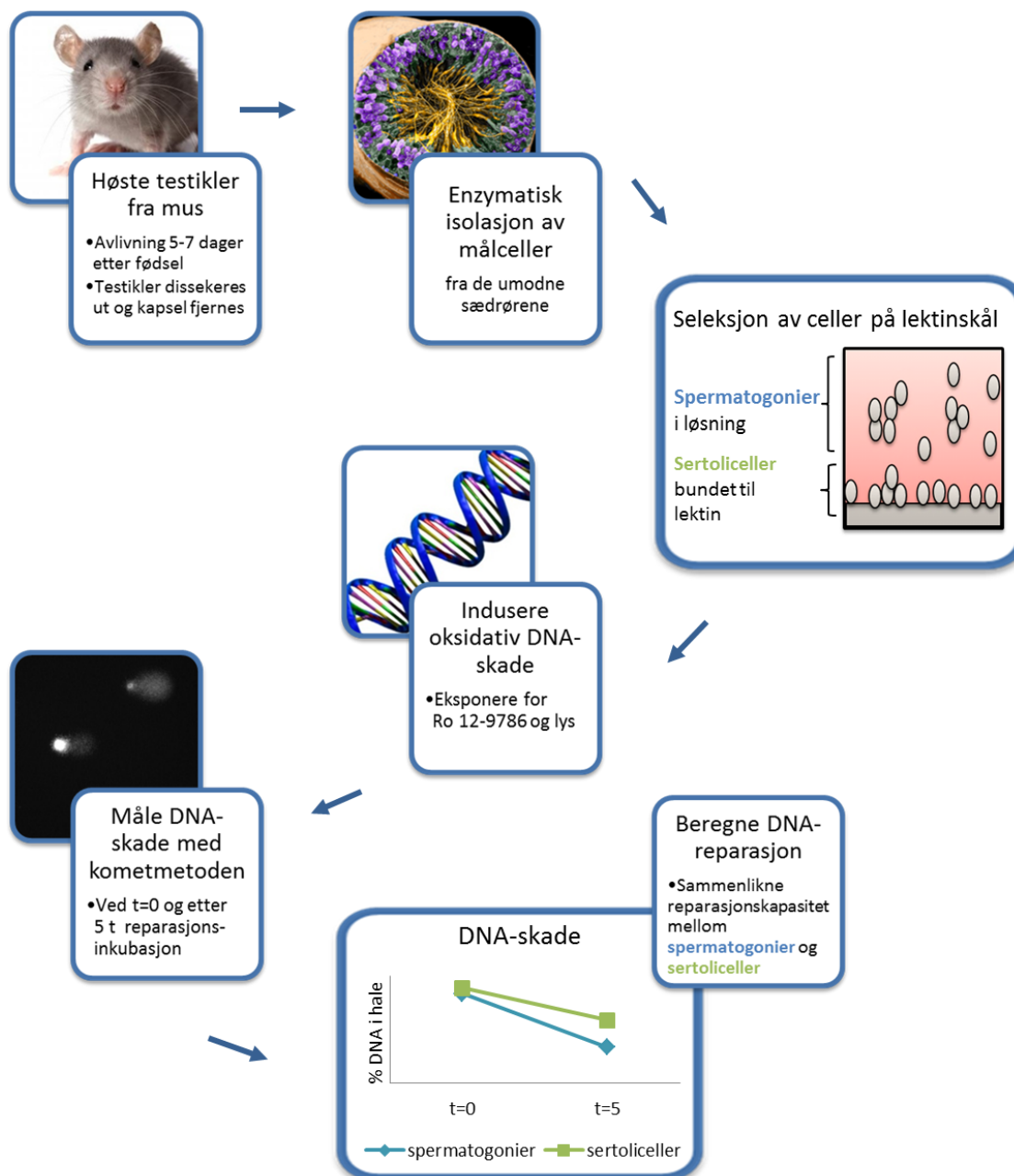
- Etablere metode for isolering av testikkelceller fra neonatale mus, samt anrikning og karakterisering av separate kulturer med spermatogonier og somatiske støttceller (sertoliceller).
- Detektere og karakterisere uttrykk av den cellulære antioksidanten Cu/Zn SOD i de ulike cellesuspensjonene.
- Måle induksjon av oksidative DNA-skader i neonatale spermatogonier og sertoliceller.
- Måle reparasjonskapasitet av oksidative DNA-skader i neonatale spermatogonier og sertoliceller og identifisere eventuelle forskjeller mellom celletypene i respons på oksidativt stress.

2. Materiale og metode

Løsninger og medier er beskrevet i vedlegg B.

2.1 Eksperimentell design

Hovedmålet i denne masteroppgaven var å undersøke induksjonssensitivitet og reparasjonskapasitet av oksiderte DNA-baser i testikkelceller fra neonatale mus. Sentrale metoder som ble brukt er oppsummert i figur 2.1.



Figur 2.1 Eksperimentell design. Bilde av sædrør er lastet ned fra http://www.cell.com/cell_picture_show-reproduction, bilde av mus og DNA-molekyl er fra Google Images.

2.2 Mus

2.2.1 Avl

C57BL6 mus ble avlet og stelt ved Nasjonalt Folkehelseinstitutt, Oslo, Norge. Avlsburene bestod av trioer, én hann og to hunner. Musene ble holdt i individuelt ventilerte engangsbur (IVC; Innovive Inc, USA) av plastikk på Nestpack (Datesand Ltd., Manchester, UK) underlag. Dyrerommet hadde 12 timers lys/mørke syklus, 6-10 luftvekslinger i timen, kontrollert fuktighet ($55\pm 5\%$) og temperatur på 19-23 °C. Vann og fôr ble gitt *ad libitum*. Dyrene ble gitt avlsfôr (HT2019) fra Harlan Laboratories Inc., Indianapolis, IN, USA. Alt dyrehold ble utført i samsvar med retningslinjer for dyreforsøk i Norge.

2.2.2 Avlivning og disseksjon av testikler

I eksperimentene ble det brukt 7-10 hannmus som var 5-7 dager gamle. Musene ble avlivet ved nakkestrekk og testiklene ble raskt dissekert ut. Kapselen ble fjernet fra testiklene ved hjelp av pinsett og saks under lupe, før testiklene ble overført til rent og kaldt RPMI medium uten føtalt kalveserum (FCS), hvor testiklene ble oppbevart på is inntil videre isolering av celler (30 min). En testikkel veier 2,2-3,5 mg hos 5-7 dager gamle mus (Drumond *et al.*, 2011) som gir en total mengde testikkelvev på 35-50 mg i hvert enkelt eksperiment.

2.3 Enzymatisk isolering av testikkelceller fra neonatale mus

Den opprinnelige metoden for isolering av testikkelceller er beskrevet av Bradley og Dysart (Bradley og Dysart, 1985), Söderlund *et al.* (Soderlund *et al.*, 1988) og Bjørge *et al.* (Bjorge *et al.*, 1995) og ble utført med modifikasjoner. Dette er en enzymatisk metode som bryter ned vev for å frigjøre enkeltceller i suspensjon. Metoden er utført under semisterile betingelser. Testikkelcellene ble inkubert ved 32 °C, 5 % CO₂ i et redusert O₂-miljø på 5 % for å etterligne testikkelcellenes naturlige miljø.

Testiklene ble overført til et sterilt glass med lokk som inneholdt 5 ml collagenase type 2 (100 U/ml) løst i RPMI medium uten FCS før inkubasjon i 15 min i vannbad, ved 32 °C og risting (104 rpm). Løsningen ble ristet ekstra godt manuelt hvert femte min. Etter inkubasjon i vannbad fikk sædrørene sedimentere i 5 min før supernatanten som inneholder ekstratubulære celler ble sugd av og fjernet. Deretter ble 1 ml collagenaseløsning tilsatt før testikkelvevet ble klippet med en liten saks til en suspensjon (ca. 20 klipp). Etter klipping ble ytterligere 4 ml collagenaseløsning tilsatt og løsningen ble inkubert på nytt i vannbad i 15 min ved 32 °C og 104 rpm. Hvert 5. min ble løsningen ristet ekstra godt manuelt. Dette andre collagenasetrinnet løser opp bindevev i sædrørene. Deretter ble 0,4 ml trypsin (20750 U/ml) og 0,2 ml DNase I (2000 U/ml) løst i RPMI medium uten FCS tilsatt under kontinuerlig risting, og løsningen ble inkubert videre i vannbad i 8 min ved 32 °C og 104 rpm. Løsningen ble ristet ekstra godt manuelt etter fire min. Trypsin eliminerer kontakten mellom celler slik at kjønncellene og sertolicellene løsner fra hverandre. DNase I tilsettes for å hindre uønsket celleklumping som oppstår når celler lyseres, fordi frigjort DNA fungerer som lim i løsningen. Etter siste inkubasjon i vannbad ble celleløsningen

filtrert gjennom gassbind og et 100 µm filter i et 50 ml falconrør på is som inneholdt 10 ml RPMI medium med FCS for å fjerne vevsfragmenter. Kalveserumet i medium begrenser enzymaktiviteten til collagenase og trypsin på cellene. Deretter ble filteret skylt med RPMI medium med FCS. Dette gjøres med romtemperert medium fordi viskositeten i løsningen øker ved lav temperatur og medfører tap av celler fordi løsningen får konsistens som gelé. Etter filtrering ble falconrøret fylt med kaldt RPMI medium med FCS til 45 ml totalvolum. Cellene ble vasket tre ganger med RPMI medium med FCS ved sentrifugering (7 min, 314xg og 4 °C) før forsiktig resuspensjon med plastpasteurpipette med stor åpning. Etter siste vask ble cellepelleten løst i 2 ml RPMI medium med FCS før løsningen ble filtrert gjennom et 40 µm filter over i et 15 ml falconrør. Filteret ble skylt med 1-2 ml RPMI medium med FCS. Cellene ble telt og fortynnet til ønsket konsentrasjon ($1,0 \times 10^6$ celler pr ml). For at cellene skulle restituere etter isoleringen ble de oppbevart i falconrør (med korken løst på) i inkubatorskapet (32 °C, 5 % O₂ og 5 % CO₂) i én time etter den enzymatiske isoleringen.

Under etablering av metode for isolering av testikkelceller i neonatale mus ble det tilført et ekstra trinn collagenasebehandling ift originalmetode fordi det var viktig å fjerne ekstratubulære celler, da videre mål var å anrike både spermatogonier og sertoliceller. I denne oppgaven ble inkubasjonstiden med collagenase redusert fra 20 min til 15 min fordi celler fra neonatale dyr har mindre bindevev enn kjønnsmodne dyr.

2.4 Seleksjon av spermatogonier og somatiske celler

Petriskåler dekket med lektin ble benyttet for å selektere celler i en løsning bestående av somatiske celler og kjønnsceller. De somatiske cellene vil binde seg til lektin mens spermatogonier blir værende i løsningen. Dermed blir begge celletyper anriket.

Lektinskålene ble laget ved å tilsette 5 ml lektin (fra *Datura Stramonium*; 5 µg/ml) løst i PBS til petriskåler (60 mm) som ble inkubert i én time ved 37 °C som beskrevet av Morena *et al* (Morena *et al.*, 1996). Lektinskålene ble deretter vasket tre ganger med 0,5 % bovine serum albumin (BSA) løst i PBS. Skålene ble tørket og lagret i romtemperatur, og i løpet av prosjektet kom vi frem til at de må brukes innen én uke etter tillaging.

Celleløsningen ($1,0 \times 10^6$ celler pr ml, totalt ca. 4 ml) ble inkubert i én time ved 32 °C, 5 % CO₂ og 5 % O₂. Valg av tidslengden for inkubasjon er basert på tidligere undersøkelser av ulike inkubasjonstider for neonatale celler fra rotte (Maass, 2008) hvor én time ble funnet til å gi høyest prosentandel spermatogonier i løsning. Etter inkubasjonen ble cellene som var i løsning sugd av skålen med en plastpasteurpipette. Skålen ble vasket svært forsiktig to ganger med RPMI medium med FCS og blandet med cellene i suspensjon. Skålen ble deretter vasket to ganger med PBS før behandling av de fastbundne somatiske cellene med EDTA-trypsin (0,05 % trypsin, 0,1 mmol/l etylendinitrilotetraeddiksyre (EDTA)). Omtrent 2 ml EDTA-

trypsin ble godt fordelt utover skålen før mesteparten ble sugd av og lektinskålen ble inkubert i 5-6 min ved 37 °C som beskrevet av Scarpino *et al.* (Scarpino *et al.*, 1998). For å løsne cellene fra skålen ble skålen dunket forsiktig. Bruk av celleskrape var nødvendig i tillegg til trypsinering. RPMI medium med FCS ble tilsatt lektinskålen for inaktivering av trypsin før de somatiske cellene ble vasket av skålen. Begge celleløsninger ble sentrifugert (5 min, 314xg, 4 °C) før cellene ble resuspendert forsiktig i RPMI medium uten FCS.

2.5 Immunocytokjemi

Immunocytokjemi er en teknikk hvor tilstedeværelsen av spesifikke proteiner eller antigener i celler visualiseres. Celler kan fikseres og permabiliseres på ulike måter, men bruk av primære og eventuelle sekundære antistoffer for å detektere ønsket antigen er felles for metodene som involverer immunologisk påvisning. Forberedelse av et preparat innebærer at cellene fikseres og om antigenet er intracellulært må cellemembranen permabiliseres slik at antistoffene får tilgang til antigenet de skal binde seg til. Hovedsakelig brukes to metoder for permabilisering, enten med organiske løsemidler (f.eks. etanol) eller med kryssbindende reagens (f.eks. paraformaldehyd (PFA)). Organiske løsemidler fjerner lipider og dehydrerer cellene, mens kryssbindende reagens danner intermolekylære bindinger som skaper et nettverk av sammenhengende proteiner. Nettverkdannelsen gjør at cellestrukturen beholdes mer intakt enn ved bruk av organiske løsemidler, men molekylstrukturen kan også endres så mye at antigenet ikke gjenkjennes av det primære antistoffet. Metoden for fiksering og permabilisering må optimaliseres for hver enkelt celletype og antigen.

Testikkelceller ble fiksert for å kunne farge med antistoffer mot anti-vimentin og Cu/Zn SOD. Etter seleksjon av spermatogonier og sertoliceller på lektinskål må kvaliteten av anrikningen vurderes for å kunne knytte dataene fra kometmetoden opp imot andelen av hver enkelt celletype for å muliggjøre en sammenlikning av disse. Testikkelceller ble derfor fiksert både før og etter seleksjon for å farge med antistoff mot vimentin, som er til stede kun i somatiske celler i testikkelen. De anrikede cellesuspensjonene ble i tillegg farget med antistoff mot Cu/Zn SOD for å undersøke en eventuell forskjell i uttrykk av antioksidantenzymet som regnes for å være en del av det primære forsvaret mot ROS.

Flere ulike fikseringsmetoder ble utprøvd før valget falt på tre ulike fikseringer, hhv etanolfiksering samt PFA-fiksering i to ulike konsentrasjoner. Etter PFA-fiksering ble cellene permabilisert i etanol eller Triton-X. Cellesuspensjon før anrikning på lektinskål ble fiksert i etanol for å oppnå god farging for anti-vimentin. Det samme gjelder de anrikede cellesuspensjonene (spermatogonier og sertoliceller). Ved og i tillegg fikse cellesuspensjonene i 0,1 % PFA, kunne cellene lagres i kjøleskapet til senere bruk dersom preparater fiksert i etanol ikke ble vellykket. For best mulig farging for Cu/Zn SOD ble de to anrikede cellesuspensjonene fiksert i 2 % PFA, da Cu/Zn SOD er et lite protein som gjør lokalisering og farging utydelig ved etanolfiksering.

2.5.1 Fiksering av celler

2.5.1.1 Fiksering og permabilisering med etanol

En celledøsning på 30 μl ($0,5\text{-}1,0 \times 10^6$ celler pr ml) ble spunnet ned i 5 min ved 300xg og 4 °C før resuspensjon i 10 μl FCS. Cellene ble strøket ut på polysindekkede objektglass og preparatene ble tørket i romtemperatur. Fiksering foregikk ved å dyppe objektglassene i romtemperert 100 % etanol i 10 min før preparatene ble vasket to ganger 10 min i PBS. Preparatene ble deretter vasket raskt i destillert vann og tørket i romtemperatur.

2.5.1.2 Fiksering med 0,1 % PFA

En celledøsning på 30 μl ($0,5\text{-}1,0 \times 10^6$ celler pr ml) ble fiksert i løsning med sluttkonsentrasjon 0,1 % PFA og ble deretter oppbevart i kjøleskap (4 °C) i PFA-løsningen. Før farging med antistoffer ble cellene spunnet ned (300xg, 5 min, 4 °C) og resuspendert i 15 μl PBS. Cellene ble strøket ut på polysindekkede objektglass og tørket ved føning. For å fjerne saltkrystaller ble preparatene skylt veldig raskt i destillert vann. Cellene ble permabilisert i 100 % etanol i 10 min eller i 0,5 % Triton-X (250 μl Triton-X i 50 ml PBS) i 15 min. Etter permabilisering ble preparatene skylt to ganger 5 min i PBS og dyppet i destillert vann før preparatene lufttørket i romtemperatur.

2.5.1.3 Fiksering med 2 % PFA

En celledøsning på 30 μl ($0,5\text{-}1,0 \times 10^6$ celler pr ml) ble fiksert i løsning med sluttkonsentrasjon 2 % PFA i 30 min i kjøleskap (4 °C). Cellene ble deretter spunnet ned (300xg, 5 min, 4 °C) og resuspendert i 15 μl 0,1 % PFA. Cellene ble strøket ut på polysindekkede objektglass og tørket ved føning. For å fjerne saltkrystaller ble preparatene skylt veldig raskt i destillert vann. Cellene ble permabilisert i 0,5 % Triton-X (250 μl Triton-X i 50 ml PBS) i 15 min. Etter permabilisering ble preparatene skylt to ganger 5 min i PBS og dyppet i destillert vann før preparatene lufttørket i romtemperatur.

2.5.2 Farging med antistoffer

2.5.2.1 Anti-vimentin

Intermediære filamenter gir struktur til plasmamembranen i cellen og organiserer i tillegg cellene inn i spesifikke vev. Vimentin er et slikt filament som er uttrykt kun i somatiske celler i testikkelen og brukes derfor for å identifisere somatiske celler (vimentinpositive). De vimentinnegative cellene antas derfor for å være kjønnsceller (spermatogonier). Ved å kombinere farging av DNA og vimentin, kan andel somatiske celler tilstede i celleduspensjonen før og etter lektinseleksjon estimeres.

Det primære antistoffet mus anti-vimentin ble titrert med fortynningsrekke 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 og 1:800. Fortynning 1:200 (i 1 % BSA løsning med 0,01 % thimerosal) ble bestemt å være optimal fortynning for å detektere vimentin. Sekundært antistoff var esel anti-mus med 1:1000 fortynning (i 1 % BSA løsning med 0,01 % thimerosal). Cellene ble farget med Hoechst 33342 (H342) og anti-vimentin

og telt manuelt ved fluorescensmikroskop (minimum 200 celler per preparat) før prosentandel vimentinnegative celler ble beregnet.

2.5.2.2 Cu/Zn SOD

Cu/Zn SOD er et lite molekyl (32 kDa) som anses for å være en del av det primære antioksidantforsvaret mot ROS i mammalske celler. Ved å farge somatiske testikkelceller og spermatogonier for Cu/Zn SOD kan man studere uttrykk og eventuell forskjell i uttrykk av enzymet i henholdsvis sertoliceller og spermatogonier. Det var også ønskelig å studere uttrykk av Cu/Zn SOD i spermatogonier vs senere stadier av kjønnsceller fra kjønnsmodne mus.

Primært og sekundært antistoff ble titrert med standard fortynningsrekker (1:100, 1:200, 1:400 og 1:800) på testikkelceller fra kjønnsmodne mus. Til farging for Cu/Zn SOD ble det primære antistoffet kanin anti-Cu/Zn SOD brukt med 1:100 fortynning (i 1 % BSA løsning med 0,01 % thimerosal). Det sekundære antistoffet esel anti-kanin ble brukt med 1:400 fortynning (i 1 % BSA løsning med 0,01 % thimerosal). Cellene ble farget med H342 og Cu/Zn SOD og studert i mikroskopet.

2.5.2.3 Prosedyre

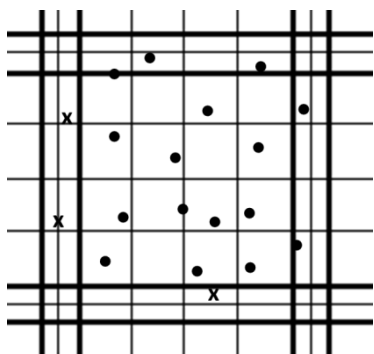
Prosedyren for farging med antistoffer var lik for anti-vimentin og Cu/Zn SOD. En PAP-penn ble brukt for å lage en hydrofob barriere rundt områdene med celler for å holde antistoffløsningene innenfor området hvor celleutstryket var. Primære antistoffløsninger ble tilsatt innenfor området markert med PAP-penn og inkubert i fuktig og lystett boks over natt ved 4 °C. Negativ kontroll ble ikke tilsatt primært antistoff, kun 0,5 % BSA i PBS. Dagen etter ble preparatene vasket to ganger 5 min i PBS før de ble skylt i destillert vann og tørket i romtemperatur. Sekundært antistoff ble tilsatt alle preparater, inkludert negativ kontroll, og inkubert i 30 min i romtemperatur og mørke. Preparatene ble vasket tre ganger med PBS i kontinuerlig bevegelse, hvor det siste badet ble tilsatt H342 (0,5 µg/ml) for å farge DNA. Preparatene ble skylt i destillert vann før de ble tørket i romtemperatur i mørket. Preparatene kan deretter oppbevares mørkt og kjølig. Preparatene ble montert med dekkglass og fluorescensmonteringsmiddel for å redusere blekning av antistoffene ved mikroskopiering. Luftbobler ble fjernet ved å trykke forsiktig på preparatet med en pipettespiss. Monteringsmiddelet må tørkes 15 min i romtemperatur før det blir undersøkt eller legges kjølig.

Immunfargede celler ble analysert med et Zeiss Axioplan 2 mikroskop (5883) utstyrt med FITC, rhodamin - og UV filter og en kvikksølvlampe (Mercury Short-Arc HBO® 100 W/2) fra Osram (Tyskland). For å ta bilder ble et Spot RT3 Slider digitalkamera (Diagnostic Instrument Inc) og bildeprogrammet Spot benyttet. En dråpe Immersol® ble lagt på preparatet for god oppløsning gjennom et 63x objektiv.

2.6 Celletelling og tester av celleintegritet

2.6.1 Celletelling

For å bestemme konsentrasjonen av testikkelcellene ble cellene telt i et Bürker tellekammer. Tellekammeret er delt inn i ni store kvadrater og hver av disse kvadratene er delt inn i 16 mindre kvadrater. Minimum tre av ni store kvadrater telles. Alle cellene innenfor et stort kvadrat blir telt (se figur 2.2), i tillegg til cellene som ligger på øverste og høyre kantlinje, men ikke cellene på nederste og venstre kantlinje, for å unngå dobbeltelling.



Figur 2.2 Et av ni store kvadrater i et Bürker tellekammer. Det store kvadratet består av 16 mindre kvadrater. Alle cellene innenfor det store kvadratet telles, i tillegg til celler på øvre og høyre kantlinje. Celler som ligger på nedre eller venstre kantlinje telles ikke og er markert med X.

Tellekammeret er 0,1 mm dypt og et stort kvadrat er 1 mm². Volumet av løsningen i en stor rute er dermed 0,1 mm³ eller 0,1 µl.

For å finne cellekonsentrasjonen ble 10 µl celledøsning overført til et Bürker tellekammer med dekkglass over løsningen. Cellene ble telt i lysmikroskop med 10x objektiv. Etter at celler i minimum tre av ni store kvadrater er telt ble gjennomsnittet beregnet (antall celler pr µl). Gjennomsnittet multipliseres med 10⁴ for å finne antall celler pr ml. Antall celler pr ml multipliseres med antall ml løsning for å finne totalt antall celler i løsningen.

2.6.2 Trypanblå eksklusjonstest

Trypanblå eksklusjonstest utføres for å undersøke cellenes membranintegritet som mål på eventuell cytotoksisitet etter enzymatisk isolering eller etter eksponering og reparasjonsinkubasjon. Ved farging med trypanblå vil levende celler med intakt cellemembran ekskludere fargestoffet. Døde celler eller celler med skadd cellemembran vil absorbere fargestoffet og opptre som blåfarget i mikroskopet. Relativt antall blå celler er en indikasjon på cytotoksisitet, men det må tas hensyn til at celler kan ha skjær cellemembran selv om cellen er intakt.

Prosedyre

Det ble tilsatt 10 µl celledøsning i 10 µl trypanblå løsning (0,4 % w/v). Etter omtrent 5 min vil fargestoffet ha blitt absorbert inn i døde og skadde celler, og cellene ble undersøkt i mikroskop i et Bürker tellekammer. Antall blå celler og ikke-fargede celler

noteres og prosent celler med intakt membran beregnes ved å dele antall levende (ikke blå) celler på totalt antall celler og multiplisere med 100.

2.6.3 Propidiumiodid eksklusjonstest

En mer sensitiv og selektiv eksklusjonstest enn trypanblå er propidiumiodid-eksklusjonstest. Propidiumiodid (PI) er et stort molekyl (molekylvekt 668,4) som krysser svekkede membraner og farger nukleinsyrer. En rød eller rosafarget celle indikerer membranskade siden DNA har blitt farget av PI. H342 er også et stort molekyl (molekylvekt 616), men krysser intakte plasmamembraner og farger nukleinsyrer i cellen. H342 binder både spesifikt og kvantitativt til DNA og sender ut blått lys når fargestoffet eksiteres med UV-lys. Bruk av H342 og PI samtidig gjør at man kan skille mellom intakte og svekkede celler. En av de første endringene i nekrotiske celler er tap av membranfunksjon og PI lekker inn i cellen og farger dem røde. Tidlig apoptotiske celler vil opprettholde cellemembranens integritet og funksjoner, og vil dermed ikke bli farget av PI eller trypanblått. Apoptotiske celler kjennetegnes av kondensasjon av DNA i kjernen og DNA-fragmentering og kan gjenkjennes morfologisk etter farging med H342 i et fluorescensmikroskop.

Prosedyre

En celleløsning på 50 μl ($0,5\text{-}1,0 \times 10^6$ celler pr ml) ble tilsatt 0,5 μl PI (0,5 mg/ml) og 0,5 μl H342 (0,5 mg/ml), og løsningen ble deretter inkubert i 15 min i mørket i romtemperatur. Cellene ble deretter spunnet ned i 5 min ved 4 °C og 300xg. Cellene ble vasket i PBS før de ble resuspendert i 5 μl FCS, som gjør at cellene opprettholder sin form og samtidig reduseres saltkrystaller i preparatet. Cellene ble strøket ut på polysindekkede objektglass og tørket over natt i en lystett boks. Cellepreparatene kan lagres i romtemperatur i mørket.

I forkant av membranintegritetsanalyse bør ikke cellene stå på is fordi kulden i seg selv gir opphav til stive membraner som kan lekke, noe som kan gi feilaktige observasjoner. Trypanblå og liknende tester måler ganske enkelt membranintegritet, ikke cellens viabilitet, siden en celle ikke trenger å være død for å ta opp trypanblå. Lav bakgrunnsskade av DNA i kontrollprøvene i kometmetoden utgjør sannsynligvis en bedre indikator på at cellene er levedyktige enn f.eks. trypanblå eksklusjonstest (Collins *et al.*, 2008).

2.7 Induksjon av oksidativ DNA-skade

Oksidative DNA-skader ble indusert i cellene ved eksponering for fotosensitiv etyl 7-okso-7h-tieno[2,3-A]-quinolisin-8-karboksylat (Ro 12-9786) og synlig lys. Konsentrasjonen av Ro 12-9786 (gave fra Dr. Elmar Gocke) ble valgt basert på tidligere arbeid ved laboratoriet og fordi dosen ikke var cytotoxisk for cellene. Eksponeringstid for synlig lys ble valgt på grunnlag av dose-respons-sammenheng etablert i samme tidsperiode ved laboratoriet i embryonale fibroblastceller fra mus (Lakså, 2012).

2.7.1 *In vitro* eksponering for Ro 12-9786 og synlig lys

En 1,2 mM Ro 12-9786 grunnløsning (løst i DMSO) ble fortynnet 1:10 i medium og tilsatt i 600 µl celledøsning ($0,7-1,0 \times 10^6$ celler pr ml) til en endelig konsentrasjon på 1 µM. Etter 2 min med Ro 12-9786 behandling ble somatiske celler og spermatogonier fordelt på totalt 8 prøver á 150 µl for lyseksponering. I tillegg ble tre kontroller inkludert for hver celletype, hvorav en var ueksponert og en var negativ kontroll tilsatt kun Ro 12-9786 som begge ble oppbevart kaldt og mørkt. En tredje negativ kontroll ble eksponert kun for synlig lys i 6 min. Under eksponeringen var cellene løst i RPMI medium uten FCS og etter eksponering ble cellene overført umiddelbart til eppendorfrør med 500 µl RPMI medium med FCS. En fiberoptisk lampe KL2500 LCD ble brukt for å eksponere prøver for synlig lys med 10 cm avstand fra celledøsningen til lyskilden. Lysintensiteten ble målt til å være 32 000 lux. Prøvene ble eksponert for synlig lys i 1,5, 3 eller 6 min. Alle prøver ble oppbevart på is før, under og etter eksponering. Prøvene ble oppbevart mørkt foruten under lyseksponering. Cellene ble spunnet ned (300xg, 5 min, 4 °C) og resuspendert forsiktig i StemPro®-34 Medium til en celletetthet på $0,5-1,0 \times 10^6$ celler pr ml.

Etter lyseksponering (dvs. induksjon av oksidativ skade) ble celler fra samtlige prøver delt i to løsninger. Celler fra den ene løsningen ble støpt direkte inn til komet ved $t=0$, i tillegg til at celleprøver ble tatt ut til fiksering og trypanblå- og PI-eksklusjonstest. Resterende celledøsning fra samtlige prøver ble overført til celledyrkningsbrett (96-brønner) med ultralav binding for å hindre at sertoliceller bandt seg fast i bunnen. Cellene ble deretter inkubert i 5 timer ved 32 °C, 5 % CO₂ og 5 % O₂ for å tillate reparasjon av induserte skader.

2.8 DNA-reparasjon

For å måle DNA-reparasjon ble cellene inkubert i en tidsperiode etter induksjon av skaden. Skadenivået av DNA ble målt like etter eksponering og etter at cellene hadde fått tid til å reparere DNA. Reduksjon i DNA-skadenivå med tid reflekterer cellens evne til å reparere den induserte DNA-skaden. Relativ prosent reparasjon beregnes etter følgende prinsipp:

$$\text{Relativ DNA-reparasjon, \%} = \frac{\text{Initielt skadenivå} - \text{Skadenivå etter inkubasjon}}{\text{Initielt skadenivå}} \times 100$$

2.8.1 Kometmetoden

Kometmetoden er en enkel, sensitiv metode for å visualisere DNA-trådbrudd i enkeltceller (Ostling og Johanson, 1984; Singh *et al.*, 1988). Celler støpes inn i en agaroseløsning som påføres den hydrofile siden av en GelBond® film, som beskrevet tidligere av Hansen *et al.* (Hansen *et al.*, 2010). Filmene legges deretter i lyseringsbuffer for å fjerne membraner og lysere cellene så det kun er DNA igjen. DNA i levende celler er negativt superkveilet siden DNA er kveilet opp rundt en histonkjerne som til sammen utgjør nukleosomene. Den høye saltkonsentrasjonen i

lyseringsbufferen løser opp histonene slik at nukleosomene forstyrres, mens DNA fremdeles er intakt og superkveilet. Filmene legges deretter i en alkalisk løsning (elektroforesebuffer). Siden $\text{pH} > 13.2$ fører det til at superkveilet DNA med enkelttrådbrudd relaxeres og tvinnes ut. Under elektroforesen vil DNA med enkelttrådbrudd vandre mot den positive polen og danne en kometliknende hale. Gelene farges slik at DNA visualiseres vha fluorescenslys i et mikroskop. Komethalens intensitet representerer mengde DNA-skade i én enkeltcelle, siden uskadet DNA forblir i komethodet.

Den alkaliske kometmetoden detekterer både DNA-trådbrudd og alkalilabile seter. Under aktiv DNA-reparasjon oppstår det intermediære baseløse seter og trådbrudd når en skadet base fjernes fra sukkermolekylet vha en DNA glykosylase. De baseløse setene gjøres om til enkelttrådbrudd under alkaliske forhold. Ved å bruke enzymer som gjenkjenner visse typer DNA-skader er det mulig å påvise andre, spesifikke DNA-skader. Dette øker sensitiviteten og spesifisiteten til metoden. Slike enzymer (ofte DNA-glykosylaser) gjenkjenner hver sin spesielle familie DNA-skader og kutter DNA-tråden der hvor skaden er, slik at den kan måles som et trådbrudd i kometmetoden. Når enzymer inkluderes inkuberes også en replikatfilm uten enzym. På den måten kan enkelttrådbrudd og alkalilabile seter samt enzymspesifikke skader kvantifiseres. Ved å trekke nivået av DNA-skade uten enzym fra nivået av DNA-skade med det spesifikke enzymet kan mengde enzymsensitive seter beregnes (Collins *et al.*, 2008). DNA-reparasjonsenzymet Formamidopyrimidine DNA-glykosylase (Fpg) fra *Escherichia coli* (*E. Coli*) gjenkjenner en rekke DNA-skader slik som oksiderte puriner (bl.a 8-oksoG), ring-åpnede puriner (formamidopyrimidiner) og AP-seter. Fpg konverterer oksidative skader som 8-oksoG til AP-seter som omdannes til enkelttrådbrudd og detekteres i kometmetoden. Fpg gjenkjenner i tillegg AP-seter, men siden AP-seter er alkalilabile konverteres disse til enkelttrådbrudd i kontrollene uten tilsatt enzym og inkluderes ikke som enzymsensitive seter (Collins *et al.*, 2008).

Fpg-råekstraktet brukt i denne oppgaven ble laget som beskrevet i Olsen *et al.* (Olsen *et al.*, 2003) og Duale *et al.* (Duale *et al.*, 2010). Aktiviteten til Fpg-ekstraktet ble målt som beskrevet av Olsen *et al.* (Olsen *et al.*, 2003). Passende konsentrasjon av Fpg-ekstraktet ble bestemt på grunnlag av tidligere etablering av dose-respons kurver i lymfocytter og embryonale fibroblastceller fra mus (personlig kommunikasjon, Kristine B. Gützkow). Disse celletypene ble behandlet med Ro 12-9786 sammen med synlig lys og induisert DNA-skadenivå ble målt i kometmetoden etter inkubasjon med ulike konsentrasjoner av Fpg. Konsentrasjonen på 0,02 $\mu\text{g/ml}$ ga en tilnærmet lineær dose-responskurve i andre typer celler og ble derfor valgt til dette eksperimentet.

Prosedyre

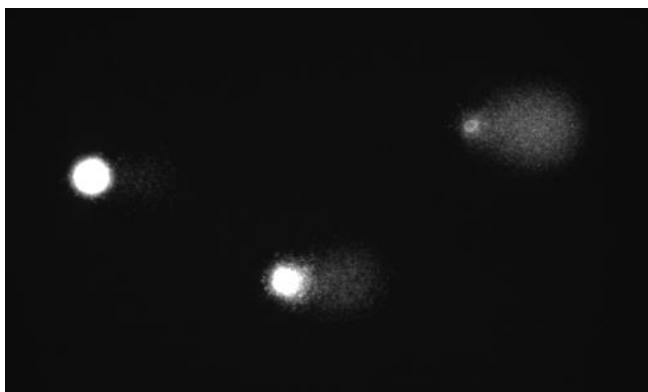
Lyseringsbuffer, elektroforesebuffer og agarose med lavt smeltepunkt (0,75 %) lages som beskrevet i vedlegg B. Agaroseløsningen oppbevares ved 37 °C og elektroforesebuffer og lysisbuffer ved 4 °C. Alle trinn ble utført i svak belysning.

GelBond® filmer ble plassert på en kuldeplate før innstøping av celler. Celler (10 µl) fra hver prøve ble overført til 90 µl agaroseløsning (1:9 fortynning) i eppendorfrør stående på varmeblokk. En multipipette ble brukt for å støpe ut celleagaroseløsningen på filmene. Hver prøve ble støpt ut i fire tekniske replikater på to separate GelBond® filmer, hvorav en film ble behandlet med enzym (Fpg) og en annen film med kun enzymbuffer. Alle filmene ble plassert i lyseringsbuffer over natt ved 4 °C. Dagen etter ble filmene skylt i destillert vann (4 °C) før ekvilibrering i enzymreaksjonsbuffer i først 10 min for å skylle bort eventuelle rester av lysisbuffer og deretter 50 min med ny buffer (4 °C). Videre ble filmene inkubert i enzymbuffer med eller uten enzym i én time ved 37 °C. Til enzymbehandlingen ble 0,2 mg/ml bovine serum albumin (BSA) tilsatt i oppvarmet (37 °C) enzymbuffer før tilsetning av enzymet Fpg til en konsentrasjon på 0,02 µg/ml. Etter enzymbehandling ble filmene plassert i alkalisk elektroforesebuffer med pH 13,2, i første omgang i 5 min for å skylle bort rester av enzymbuffer, deretter i 35 min ved 4 °C. Elektroforese ble kjørt i 25 min ved 8 °C, 25 V og ca. 700 mA som tilsvarer ca. 0,9 V/cm. Etter elektroforese ble filmene skylt raskt i destillert vann før de ble nøytralisert i buffer med pH 7,5 i to ganger 5 min i romtemperatur. Filmene ble igjen skylt i destillert vann før dehydrering og fiksering i absolutt etanol i 5 min, før siste fiksering i ny absolutt etanol i minimum 90 min. Filmene ble tørket over natt før de ble lagret i romtemperatur i mørket.

DNA ble farget med SYBR® Gold ved å plassere hver film i 50 ml TE-buffer tilsatt 40 µl SYBR® Gold (grunnløsning ble fortynnet 1:10 000). Farging foregikk i 20 min med forsiktig risting i mørket. Etterpå ble filmene skylt i destillert vann og montert med dekkglass. Filmene ble lagret i en fuktig boks i kjøleskapet (8 °C) til de var ferdig analysert innen tre dager etter farging.

2.8.2 Analyse av DNA-skader

Ved å farge DNA med SYBR® Gold vil det sendes ut et fluoriserende lys. Analyse av DNA-fargede kometer ble utført med et Olympus BX51 fluorescensmikroskop (Japan) med en Olympus brenner med kvikksølvlampe (Mercury Short-Arc HBO® 100 W/2 lampe) fra Osram (Tyskland). Et A312f kamera (Basler Vision Technologies, Tyskland) er tilkoblet en datamaskin hvor bildeanalyseprogrammet Comet assay IV fra Perspective Instruments ble benyttet for å beregne fluorescensintensiteten som sendes ut fra kometens hode og hale og sammenlikner denne. Kometene (figur 2.3) ble analysert med et 20X objektiv (totalt 200xforstørrelse) og totalt 150 kometer ble analysert fra hver prøve fordelt på fire tekniske replikater. Intensiteten i komethalen relativt til intensiteten i komethodet brukes for å måle DNA-skade i enkeltcellen, som øker lineært med bruddfrekvensen i DNA (Lovell og Omori, 2008). Nivå av DNA-skade rapporteres som prosent DNA i halen. Overlappende kometer ble ekskludert da programmet ikke skiller mellom disse.



Figur 2.3 Bilde av kometer. Tre kometer med forskjellig grad av DNA-skade, henholdsvis omtrent 5 %, 50 % og 90 % DNA-skade (% DNA i hale), hvor intensiteten av DNA i hale representerer mengden DNA-skade i en enkelt celle. DNA er farget med fluorescerende fargestoff og analysert gjennom et fluorescensmikroskop.

2.9 Tilleggseksperiment – effekt av O₂-miljø på reparasjonskapasitet

Det var ønskelig å evaluere om oksygeninnholdet i omgivelsene har innvirkning på testikkelcellenes reparasjonskapasitet. Blandete testikkelcellesuspensjoner fra neonatale mus og kjønnsmoden mus ble inkludert i eksperimentet. Det ble isolert testikkelceller fra én kjønnsmoden mus (ca. 3 mnd. gammel) og fra to neonatale mus 7 dager etter fødsel. På grunn av mangel på tid ble ikke eksperimentet gjentatt.

Den enzymatiske isoleringen av testikkelceller fra kjønnsmoden mus ble utført på samme måte som beskrevet for neonatale mus, med unntak av omtrent 100 klipp i testikkelen fra kjønnsmoden mus. Etter isolering av testikkelcellene ble celletettheten på grunn av lite vev fra neonatale mus justert til omtrent 0,3-0,4 millioner pr ml i begge prøver. Testikkelcellesuspensjonene fra kjønnsmoden mus og neonatal mus ble delt i to prøver og stående 1 time i inkubasjonsskapet ved henholdsvis 5 % O₂ og 20 % O₂. Hver av prøvene ble delt i to, hvorav en prøve var negativ kontroll (uekspontert) og en annen prøve ble eksponert for 1 µM Ro 12-9786 sammen med 3 min synlig lys som beskrevet i eksperimentet med neonatale mus. Oppsettet bestod av totalt åtte prøver á 150 µl ved eksponering. Reparasjonsinkubasjonstiden var fem timer, enten ved 5 % O₂ eller 20 % O₂. Alle celler ble inkubert i RPMI medium med FCS. Trypanblå eksklusjonstest ble utført på cellene før induksjon av oksidativ DNA-skade, etter induksjon av skade og etter fem timer inkubasjonstid.

2.10 Statistiske metoder

2.10.1 Biologiske og tekniske replikater

Lovell og Omori (Lovell og Omori, 2008) anbefaler å inkludere flere biologiske replikater i et eksperiment. I dette eksperimentet ble det på grunn av begrenset mengde testikkelvev ikke inkludert flere biologiske replikater. Med dobbelt så mange testikler tilgjengelig før isolering av celler kunne to biologiske replikater blitt inkludert i hvert eksperiment, men det ville ha blitt praktisk vanskelig å utføre. Av samme årsak (begrenset mengde testikkelvev og logistikk på laboratoriet) kunne det ikke

inkluderes flere tekniske replikater av hver prøve. Målet var derfor å utføre minimum tre identiske, uavhengige eksperiment og se på hvert enkelt eksperiment som et biologisk replikat. Det ble inkludert fire tekniske replikater av hver prøve i kometmetoden. Disse replikatene tar høyde for eventuelle metodiske utfordringer underveis i kometmetoden.

2.10.2 Fremstilling av data

For hver prøve ble det lest av DNA-skade i 150 enkeltceller (kometer) fordelt på fire tekniske replikater og medianverdien ble ekstrahert ut fra rådata for presentasjon i denne oppgaven. Kometdata avviker vanligvis fra normalfordeling og gjennomsnittet av % DNA i halen vil som regel gi et feil bilde på cellepopulasjonen, dersom denne avviker fra medianen. I mine datasett er det noe varians innad i prøvene og medianen velges fremfor gjennomsnitt siden medianen ikke tar hensyn til de ekstreme ytterverdiene. Medianen sier imidlertid ikke om det er hele cellepopulasjonen eller kun en del som er blitt skadet eller har reparert. Ved bruk av CometMacro, en Excel makro utviklet av Perceptives, kan man kontrollere dette ved å se på frekvensdiagram som viser spredning av celler ved ulike skadenivå.

Resultatene er fremstilt i stablede søylediagrammer for å få vist både enkelttrådbrudd og oksidativ skade ved $t=0$ og $t=5$. På grunn av de varierende resultatene er eksperiment A, B og C presentert hver for seg. Siden denne fremstillingen viser kun medianverdien, er det i vedlegg A lagt ved et datasett fremstilt i boksplott for å illustrere hvordan variansen i datamaterialet er ved å vise gjennomsnitt, median, første og tredje kvartil, samt "uteliggere". Den typiske fordelingen av celler med ulik mengde DNA-skade i hver prøve er i tillegg vist i et frekvensdiagram i oppgaven.

Microsoft Office Excel 2010 for Windows ble brukt for å lage størsteparten av figurene og beregne gjennomsnitt og standardavvik. CometMacro ble brukt for å lage frekvensdiagram og SigmaPlot ble brukt for å lage boksplott.

2.10.3 Statistisk analyse av kometdata

Det finnes ingen klare retningslinjer for statistisk analyse av kometdata, et problem som er diskutert i en oversiktsartikkel av Lovell og Omori (Lovell og Omori, 2008). En av årsakene til mangel på standard statistisk metode er at kometdata vanligvis ikke er normalfordelt. Undersøkelser om normalfordeling kan gjøres ved å lage et frekvenshistogram over fordelingen av kometdataene eller Shapiro-Wilkinson. Hvis dataene ikke kan analyseres med parametriske tester kan man alternativt kjøre ikke-parametriske statistiske tester som f.eks. Mann-Whitney eller Kruskal Wallis. Dataenes fordeling er avhengig av DNA-skadenivå; ved lave doser og induksjon av lite DNA-skade har data en tendens til å være høyreforskyvd og ved høyere doser og induksjon av mye DNA-skade er dataene venstreforskyvd i forhold til normalfordeling (Lovell og Omori, 2008). En logaritmisk transformasjon av dataene vil kunne gi normalfordeling av høyreforskyvde data, men ikke av venstreforskyvde (Lovell og Omori, 2008).

For å kunne utføre statistisk analyse av kometdata er det nødvendig med resultater fra tre biologiske uavhengige eksperimenter. På grunn av begrenset antall eksperimenter kunne ikke statistisk signifikans beregnes. En tydelig forskjell ble likevel observert og hvis det hadde blitt utført tre eller flere eksperimenter ville man kunne utført statistiske analyser for å sjekke statistiske signifikante forskjeller mellom celletypene i reparasjonskapasitet. Parametriske tester har høyere teststyrke enn ikke-parametriske tester, men førstnevnte krever normalfordeling av data. Variansanalyse (ANOVA) er en parametrisk test som kan være relativt robust selv når antagelsen om normalfordeling brytes og tåler en viss varians mellom gruppene som testes. Generelt sagt, dersom kravet om normalfordeling og liten varians ikke oppfylles, må ikke-parametriske tester brukes.

3. Resultater

For å oppnå mer kunnskap om reparasjonskapasiteten av oksidative skader i testikkelceller fra neonatale mus ble spermatogonier og sertoliceller isolert enzymatisk. Etter anriking av spermatogonier og sertoliceller ble cellene eksponert for tre doser av lys og Ro 12-9786. Målet var å kunne dokumentere induisert skadenivå og en eventuell forskjell i reparasjonskapasitet mellom spermatogonier og deres støtteceller.

Etablering av metoder var mer utfordrende enn forventet, og på grunn av tidsbegrensninger er det ikke oppnådd tre eksperimenter med fullstendige data. De utførte eksperimentene vil derfor bli presentert hver for seg omtalt som eksperiment A, B og C.

3.1 Isolasjon og seleksjon av testikkelceller fra neonatale mus

For å studere induksjon og reparasjon av oksidative DNA-skader i spermatogonier og sertoliceller ble testikkelceller isolert fra neonatale mus. Ved å avlive mus 5-7 dager etter fødselen antas det at alle kjønnsceller i testikkelen er spermatogonier, siden de første spermatocytene opptrer fra dag åtte etter fødselen. Utbyttet av testikkelceller etter enzymatisk isolering av testikkelvev fra 7-10 neonatale mus var omtrent 4 millioner celler. Spermatogonier og sertoliceller ble anriket ved seleksjon av adherente celler (somatiske celler) på lektinskål. De somatiske cellene ble løsnet fra lektinskålen ved trypsinering og skraping. Fraksjonen av begge celletyper (renhet) i de to populasjonene ble bestemt ved farging med antistoff mot vimentin.

3.1.1 Fiksering og farging med antistoffer

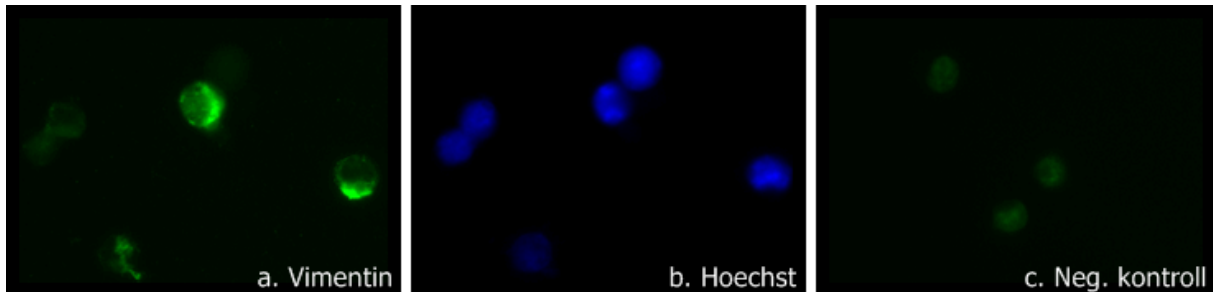
Etter uttesting av flere ulike fikseringsmetoder falt en avgjørelse på 0,1 % PFA og 100 % etanol for farging med antistoffer mot vimentin og fiksering i 2 % PFA for farging mot Cu/Zn SOD. Primære og sekundære antistoffer ble titrert og optimal fortykning av alle antistoffer ble bestemt.

3.1.2 Anriking av spermatogonier

For å bestemme andelen spermatogonier og sertoliceller i cellesuspensjonene etter anriking ble cellepreparatene farget med antistoff mot vimentin. Siden vimentin farger somatiske testikkelceller (vimentinpositive), antas ufargede celler å være spermatogonier (vimentinnegative). Sertolicespesifikk markør ble ikke brukt, så selv om de adherente cellene omtales som sertoliceller i denne oppgaven, kan det være noe forurensning av andre somatiske celler som endotelceller og glatte muskelceller.

Preparatene som ble farget for vimentin ble fiksert i 100 % etanol eller 0,1 % PFA. Det ble oppnådd god farging for vimentin i de presenterte eksperimentene, som vist i figur 3.1. Cellesuspensjonen før seleksjon på lektinskål bestod av $47,5 \pm 3,1$ % vimentinpositive celler (sertoliceller). Etter seleksjon var gjennomsnittlig andel

vimentinpositive celler i sertolicellesuspensjonen $85,3 \pm 7,3$ %. I spermatogoniesuspensjonen var gjennomsnittlig andel vimentinpositive celler $21,7 \pm 5,7$ %, og resterende celler antas å være spermatogonier. Andelen vimentinpositive og vimentinnegative celler i de to celsuspensjonene i hvert enkelt eksperiment er presentert i tabell 3.1.



Figur 3.1 Testikkelceller fra neonatale mus farget med antistoff mot vimentin. Bildet til venstre (a) viser testikkelceller før seleksjon farget med antistoff mot vimentin hvor kun somatiske celler farges sterkt grønne (vimentinpositive celler). DNA er farget blå med fargestoffet Hoechst 342 (bilde b). Ved å sammenlikne antall hoechstfargede og vimentinpositive celler kan andel av de enkelte celletypene i suspensjonen bestemmes. Negativ kontroll (tilsatt kun sekundært antistoff) viser autofluorescens og/eller uspesifikk farging (bilde c).

Tabell 3.1 Anrikning av spermatogonier (vimentinnegative) og sertoliceller (vimentinpositive).

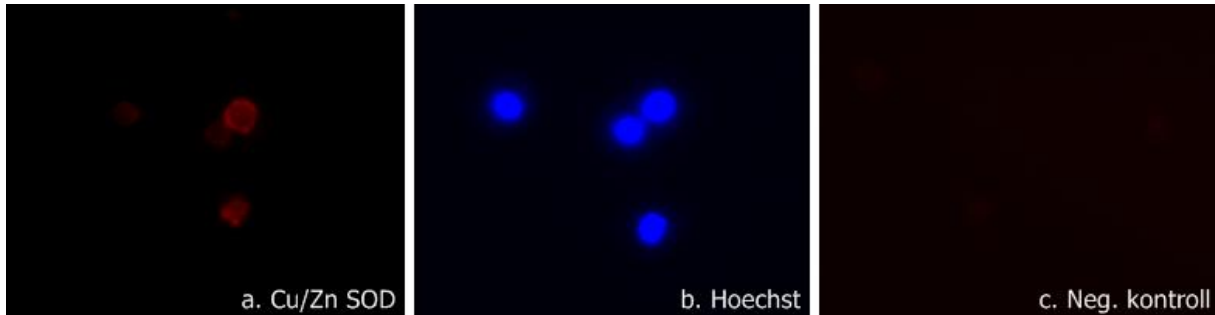
| Eksperiment | Preparat | Vimentinpositive % |
|--|-------------------------|----------------------------------|
| A | Spermatogoniesuspensjon | 22,8 |
| | Sertolicellesuspensjon | 76,8 |
| B | Spermatogoniesuspensjon | 26,8 |
| | Sertolicellesuspensjon | 89,3 |
| C | Spermatogoniesuspensjon | 15,5 |
| | Sertolicellesuspensjon | 89,7 |
| Gjennomsnitt vimentinpositive i spermatogoniesuspensjon | | $21,7 \pm 5,7$ |
| Gjennomsnitt vimentinpositive i sertolicellesuspensjon | | $85,3 \pm 7,3$ |

3.2 Cu/Zn superoksid dismutase (SOD) i testikkelceller

Cu/Zn SOD er en del av det primære antioksidantforsvaret i mammalske celler. Siden målet i denne oppgaven er å karakterisere induksjon og kapasiteten til å reparere oksidative DNA-skader i testikkelceller fra neonatale mus, er det interessant å farge med antistoff mot Cu/Zn SOD. En eventuell forskjell i uttrykk av antioksidantenzymet i henholdsvis sertoliceller og spermatogonier kan indikere en forskjell i det generelle forsvaret mot ROS. Spermatogonier og sertoliceller ble fiksert i 2 % PFA før preparatene ble farget for Cu/Zn SOD.

I både spermatogonie – og sertolicellepreparater farget for Cu/Zn SOD ble det observert positivt fargede celler med varierende intensitet. Det var ikke mulig å kvantifisere mengde Cu/Zn SOD i de ulike celletypene, men det ble observert et noe høyere antall sterkt fargede celler i spermatogoniepreparatet i forhold til

sertolicellepreparatet. Figur 3.2 viser testikkelceller farget for Cu/Zn SOD hvor to av totalt fire celler farger sterkt for Cu/Zn SOD. Negativ kontroll (tilsatt kun sekundært antistoff) viste lite eller ingen uspesifikk binding til sekundært antistoff eller autofluorescens. Observasjonen ble ikke gjentatt og bør undersøkes nærmere.



Figur 3.2 Testikkelceller (spermatogoniepreparat) fra neonatale mus farget med antistoff mot Cu/Zn SOD. Bildet til venstre (a) viser testikkelceller farget med antistoff mot Cu/Zn SOD, hvor to av fire celler har intens rødfarge. DNA er farget blå med fargestoffet Hoechst 342 (bilde b). Ved å sammenlikne antall hoechstfargede og Cu/Zn SOD-fargede celler, kan man se hvor mange av hoechstfargede celler som også farges sterkt eller svakt røde. Negativ kontroll (tilsatt kun sekundært antistoff) viser uspesifikk binding og/eller autofluorescens (bilde c).

3.3 Celleintegritet

For å undersøke cellenes membranintegritet etter enzymatisk isolering ble det utført trypanblå - og/eller PI-eksklusjonstest. Testene ble i tillegg utført etter induksjon av skade og etter fem timer reparasjon for å undersøke om eksponeringsdosene var cytotoxiske.

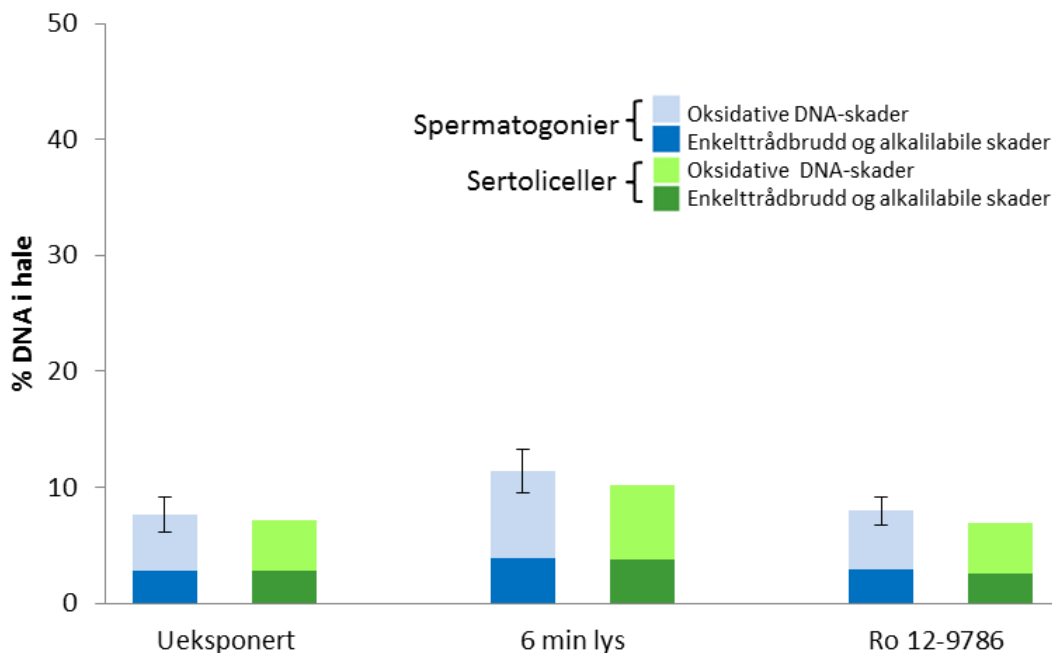
3.3.1 Trypanblå- og PI-eksklusjonstest – test for cellemembranintegritet

Én time etter enzymatisk isolering ble testikkelcellene undersøkt med trypanblå- eller PI-eksklusjonstest før seleksjon på lektinskål. Etter eksponering ($t=0$) og etter reparasjonsinkubasjon ($t=5$) ble det utført trypanblå- eller PI-eksklusjonstest på samtlige kontrollprøver og eksponerte prøver, dog varierte det hvilke tester som ble utført på hvilke prøver i eksperiment A, B og C. På grunn av svært begrensede prøvevolum, samt tidsbegrensninger, var det ikke mulig å utføre begge tester på alle prøvene. PI preparater ble laget slik at man av praktiske grunner kunne studere viabiliteten dagen etter. Enkelte PI-preparater var dessverre vanskelige å telle fordi kjønnscellene hadde en tendens til å klumpe seg sammen, spermatogonier er som nevnt i introduksjonen vanligvis paret eller i rekker i sitt naturlige miljø.

Trypanblå- og PI-eksklusjonstest én time etter enzymatisk celleisolering viste gjennomgående 15-20 % skadde celler. Etter seleksjon på lektinskål og eksponering ($t=0$) var omtrent 20-40 % av både spermatogonier og sertoliceller skadde. Sertoliceller ble trypsinert og skrapet av lektinskålen og hadde noe høyere andel skadde celler enn spermatogoniefaksjonen. Etter fem timer reparasjon viste membranintegritetstestene 15-30 % skadde celler, som i de fleste tilfeller var en svak nedgang fra $t=0$. I eksperiment C var det kun en liten andel (10 %) av sertolicellene som ekskluderte trypanblått, disse ble derfor utelatt fra analyse.

3.3.2 Bakgrunnsnivå av DNA-skade i kometmetoden

Siden trypanblå- og PI-eksklusjonstest først og fremst er en test for membranintegritet, og ikke celledød, vektlegges bakgrunnsnivåer av DNA-skader cellene målt med komet for å gjenspeile cellenes vitalitet. Den initiale DNA-skaden var lav i samtlige kontroller, se figur 3.3 for gjennomsnitt av medianverdiene i eksperiment A, B og C (kun A og B for sertoliceller). Samtlige kontrollprøver ble også analysert etter fem timer reparasjonsinkubasjon og viste uendrete bakgrunnsnivåer av DNA-skade. Lav bakgrunnsskade i komet er et kvalitetskriterium for den tekniske delen av eksperimentet i forhold til bestemmelse av DNA-reparasjonskapasitet. To eksperimenter ble ekskludert på grunnlag av eksklusjonskriteriene da medianverdien i både kontrollprøver og eksponerte prøver viste > 80 % DNA-skade.



Figur 3.3 Lavt bakgrunnsnivå av DNA-skader i spermatogonier og sertoliceller målt med kometmetoden. Søylen viser henholdsvis enkeltråddbrudd og alkalilabile DNA-skader, samt oksidative skader i tre kontrollprøver (ueksponert prøve, kun 6 min lys, kun 1 μ m Ro 12-9786) ved t=0. Blå søyler er gjennomsnittet av medianverdiene fra tre eksperimenter med spermatogonier, hvor standardavvik på gjennomsnitt av total skade er markert. Grønne søyler er gjennomsnittet av medianverdiene fra to eksperimenter med sertoliceller. Minste og største verdi for total DNA-skade i sertoliceller var 5,9 og 8,4 (ueksponert), 7,0 og 13,3 (6 min lys) og 5,5 og 8,3 (Ro 12-9786).

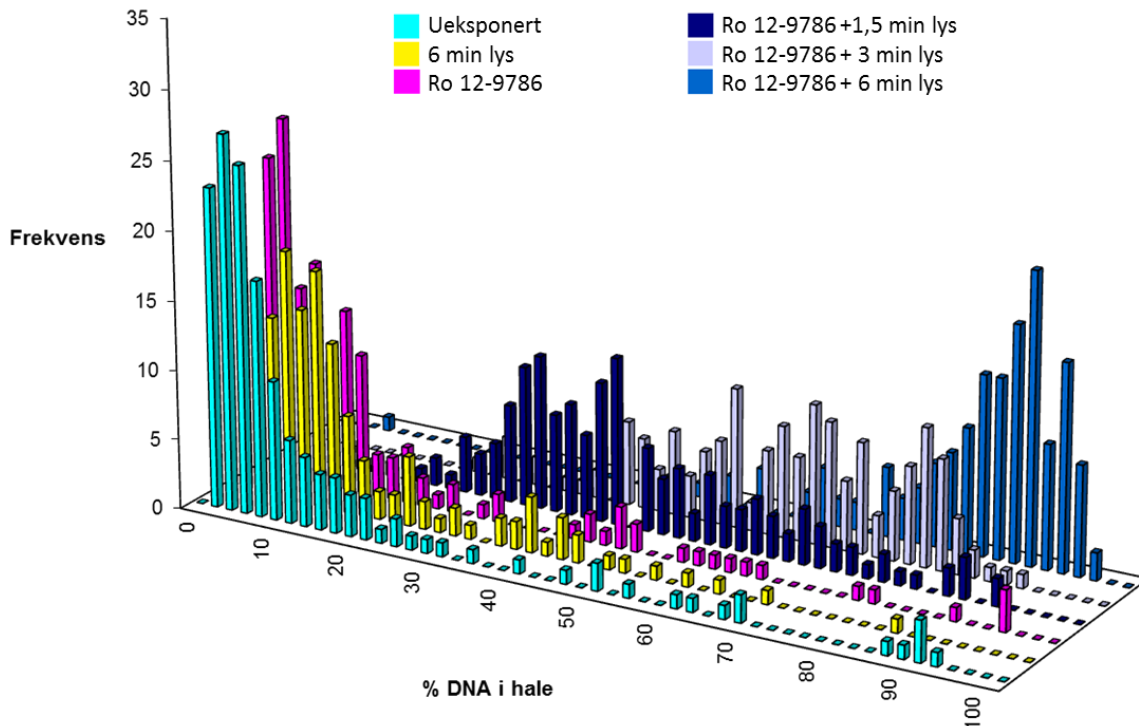
3.4 Induksjon og reparasjon av oksidative DNA-skader

For å studere reparasjon av oksidative skader i spermatogonier og sertoliceller ble det induert oksidative DNA-skader med synlig lys og Ro 12-9786. Ved bruk av det skadespesifikke enzymet Fpg i kometmetoden ble oksidativ DNA-skade målt ved nulltid (t=0) og etter fem timer reparasjonsinkubasjon (t=5). Resultatene ble brukt til å beregne reparasjonskapasiteten til de to celletypene. Under etablering av studiet ble cellene inkubert i tre timer etter eksponering, i henhold til tidligere erfaringer med

differensierte testikkelceller og med spermatogonier fra rotte. Ved laveste eksponeringsdose viste begge celletyper omtrent 20 % relativ fjerning av induserte DNA-skader. I de videre eksperimentene ble reparasjonsinkubasjonstiden økt til fem timer for å oppnå større andel reparasjon.

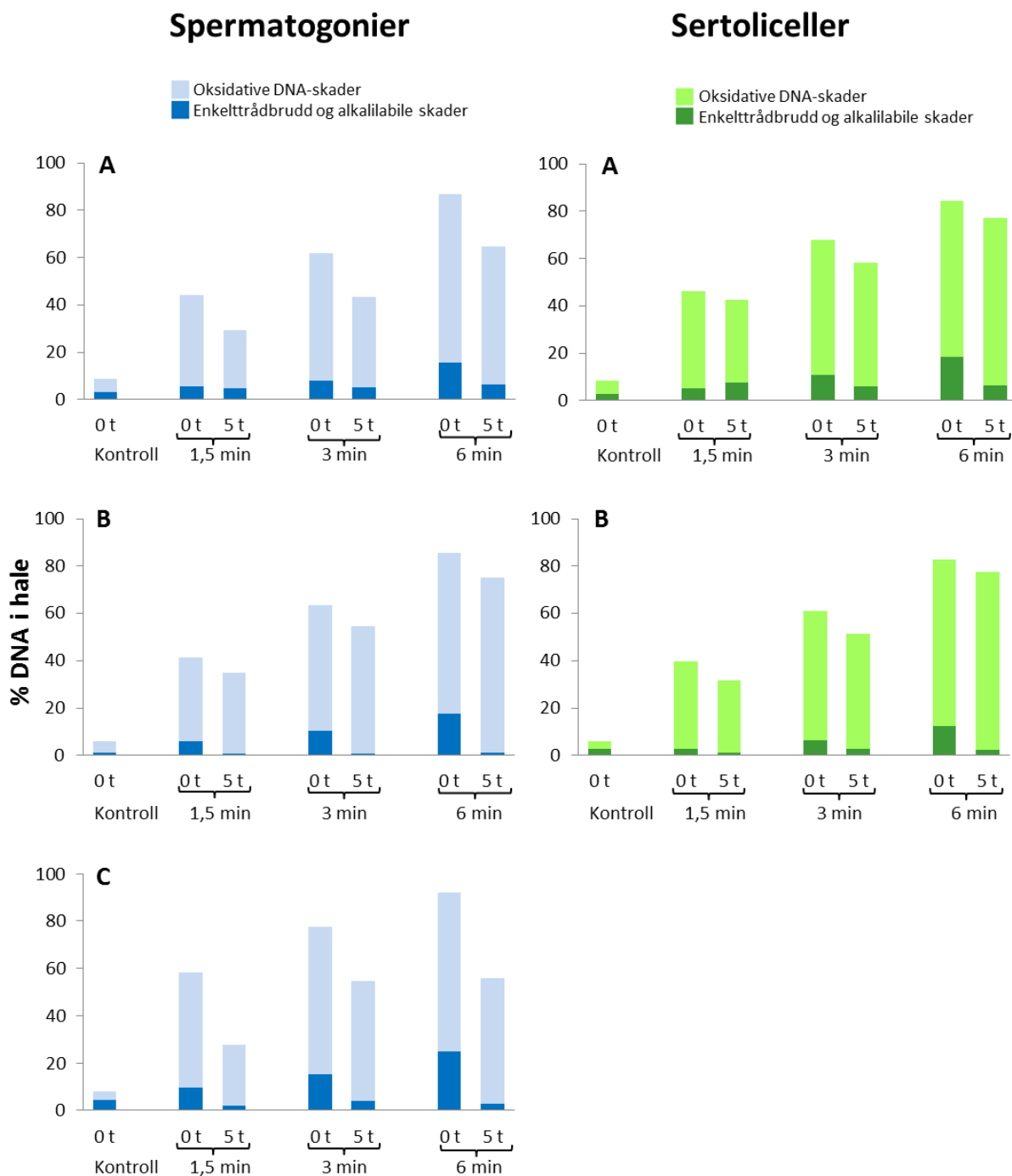
Til tross for lav bakgrunnsskade (figur 3.3) ble det observert noe varierende resultater. De tre uavhengige eksperimentene er derfor presentert hver for seg, omtalt som eksperiment A, B og C. Sertoliceller fra eksperiment C utelukkes fra det presenterte datamaterialet fordi størsteparten av kometene i hver prøve hadde >80 % DNA i halen etter fem timer reparasjonsinkubasjon. I tillegg var andel skadde sertoliceller i trypanblå eksklusjonstest > 90 %. I dette eksperimentet ble de somatiske cellene skrapet av lektinskålen uten bruk av trypsin først.

I samtlige eksperiment ble det observert en tydelig dose-respons av Fpg-sensitive skader etter økende eksponering i både spermatogonier og sertoliceller (se illustrasjon i figur 3.4). Hver prøve innehar en variasjon mellom de individuelle kometene/cellene, som vist i figur 3.4. Et boksplott som presenterer variasjonen i en prøve er vist i figur A.1 i vedlegg A. I de videre figurene er det kun medianverdien som representerer skadenivå (% DNA i hale) i hver cellepopulasjon.



Figur 3.4 Dose-respons av oksidative DNA-skader i testikkelceller. Frekvensdiagrammet viser en typisk fordeling av celler (her: spermatogoniesuspensjonen) med ulike nivåer av induert oksidativ DNA-skade (vist i kometmetoden som % DNA i hale). I samtlige kontroller (ueksponterte celler, celler eksponert for kun lys (6 min) og celler eksponert for kun Ro 12-9786 (1 μ m)) er frekvensen høy av celler med lite DNA-skade. Eksponerte celler er utsatt for 1 μ m Ro og økende lyseksponering (1,5, 3 eller 6 min med lys).

Nivåene av induert oksidativ DNA-skade i de to celletypene (spermatogonier og sertoliceller) var forholdsvis like (figur 3.5). Ved henholdsvis 1,5 min, 3 min og 6 min belysning er den initielle mengden oksidativ skade hos begge celletyper målt til å være omtrent 40, 55 og 70 % DNA i hale. Spermatogoniene i eksperiment C har høyere nivå av induert DNA-skade enn i eksperiment A og B, hvor laveste eksponeringsdosedose har en medianverdi på nesten 60 % DNA i hale. Det ble observert en liten økning av enkelttrådbrudd og alkalilabile lesjoner ved høyere eksponeringsdoser i både spermatogonier og sertoliceller. I samtlige eksperimenter ble det observert en reduksjon i DNA-skade i både spermatogonier og sertoliceller etter fem timer reparasjonsinkubasjon (figur 3.5). Det ser ut til å være en generelt høyere reparasjon ved lavere dose. Spermatogonier har tydelig høyere reparasjon i eksperiment A og C enn i eksperiment B. Størst reduksjon i DNA-skade fra t=0 til t=5 i spermatogonier er ved laveste dose i eksperiment C. Her var induksjonen av oksidativ DNA-skade noe høyere sammenliknet med de to andre eksperimentene. Sertoliceller har forholdsvis lik nedgang i skade fra t=0 til t=5 ved eksperiment A og B (se også figur 3.6).

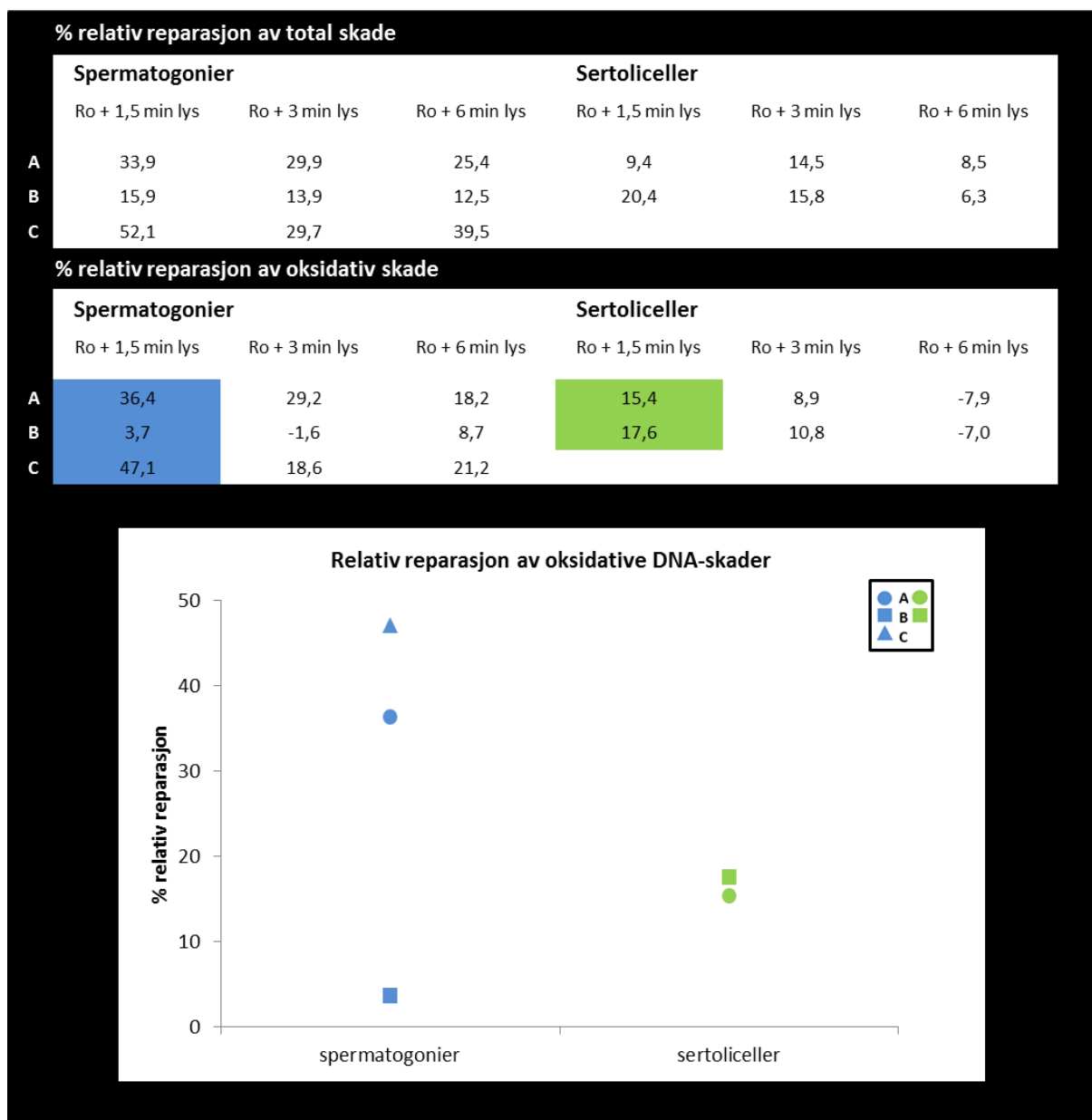


Figur 3.5 DNA-reparasjon av induerte oksidative skader i spermatogonier og sertoliceller fra neonatale mus. Spermatogonier og sertoliceller ble eksponert for oksidativ agens i tre ulike doser ($1 \mu\text{M}$ Ro + 1,5, 3 eller 6 min lys). Mengde DNA-skade i cellene er vist like etter eksponering (0t) og etter fem timer reparasjonsinkubasjon (5t) i eksperiment A, B og C. Data fra sertoliceller er presentert kun fra eksperiment A og B. Mørk farge representerer enkelttråddbrudd og alkalilabile skader, lys farge representerer oksidative (Fpg-sensitive) DNA-skader. Kontroller presentert i figuren er ueksponerte celler.

Tabellen i figur 3.6 gir en oversikt over beregnet relativ reparasjon (%) av total skade og oksidativ skade for spermatogonier og sertoliceller i alle eksperimenter.

Nedgangen i DNA-skade etter fem timer reparasjonsinkubasjonstid er generelt lavere i sertoliceller enn i spermatogonier. Fokus i denne oppgaven er på oksidative DNA-skader, derfor vil reparasjon av Fpg-sensitiv skade vektlegges videre, ofte omtalt som oksidativ DNA-skade. For å sammenlikne spermatogonier og sertoliceller tas det utgangspunkt i datasettet fra laveste eksponeringsdose, fordi nivået av enkelttrådbrudd og alkalilabile skader er lavest ved denne dosen. Spermatogonier viser høyest andel reparasjon av oksidative DNA-skader i eksperiment A og C, henholdsvis 36,4 og 47,1 %. I eksperiment B viser spermatogonier kun 3,7 % reparasjon av de induserte DNA-skadene. Sertoliceller i eksperiment A og B har en relativ reparasjon på 15,4 % og 17,6 % av oksidative DNA-skader. Sett bort i fra den lave reparasjonen spermatogonier viser i eksperiment B, er mengden reparerte DNA-skader større i spermatogonier enn i deres støttceller på disse cellestadiene i neonatale dyr.

Ved høyeste eksponeringsdose i sertoliceller er nivået av oksidative DNA-skader høyere etter fem timer reparasjonsinkubasjon enn ved induksjon av skade. Nivået av enkelttrådbrudd og alkalilabile skader går imidlertid ned fra $t=0$ til $t=5$, og det ser derfor ut som at sertoliceller har en svært lav relativ reparasjon av total skade. I det innledende studiet med tre timer reparasjonsinkubasjonstid viste sertolicellene samme tendens (resultater ikke presentert). Dette er ikke tilfelle i spermatogonier, som har en reduksjon av oksidativ DNA-skade også ved høyeste eksponeringsdose.



Figur 3.6 Relativ reparasjon av total og oksidativ DNA-skade i spermatogonier og sertoliceller fra neonatale mus. Tabellen viser relativ reparasjon (%) av total DNA-skade og oksidativ (Fpg-sensitiv) DNA-skade i spermatogonier og sertoliceller i eksperiment A, B og C. Punktdiagrammet illustrerer variasjonen i reparasjonskapasitet i og mellom begge celletyper ved laveste eksponeringsdose i de tre eksperimentene (Ro 12-9786 + 1,5 min lys).

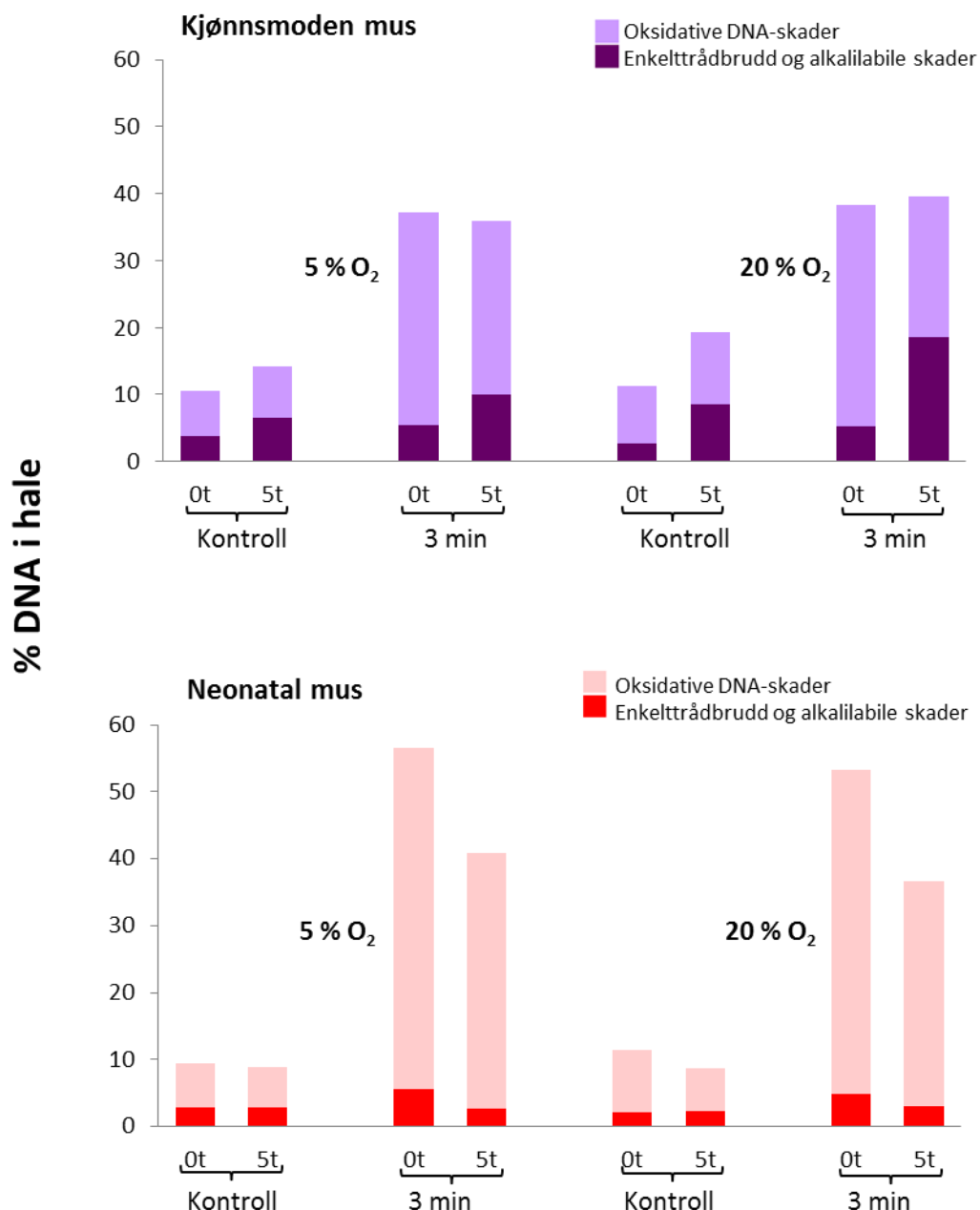
3.5 Reparasjonskapasitet ved redusert oksygen

Det var ønskelig å evaluere om oksygeninnholdet i omgivelsene har innvirkning på testikkelcellenes reparasjonskapasitet av tre grunner. Først og fremst har testikkelcellenes naturlige miljø redusert oksygen i forhold til andre vev. Siden tidligere publiserte studier (Olsen *et al.*, 2003) er basert på inkubasjon av testikkelceller fra kjønnsmodne mus ved 20 % O₂, ble testikkelceller fra neonatale og kjønnsmodne mus inkludert i studiet for å sammenlikne reparasjonskapasitet mellom testikkelceller fra neonatale dyr og kjønnsmodne dyr. I tillegg har tidligere

eksperiment i rotte på samme laboratorium vist bedre viabilitet av spermatogonier ved 5 % O₂ enn ved 20 % O₂ (Maass, 2008). Testikkelceller fra kjønnsmoden og neonatale mus ble eksponert for oksidativ agens (1 µm Ro 12-9786 + 3 min synlig lys) og inkubert i redusert oksygen (5 %) eller ved normalt oksygeninnhold (20 %) i fem timer. Som følge av lite vev fra neonatale mus ble celletettheten justert til 0,3-0,4 millioner celler pr ml. Volumet av én prøve ved eksponering var kun 150 µl fra både kjønnsmoden og neonatale mus. Trypanblå eksklusjonstest viste 10-15 % skadde celler etter isolasjon, induksjon av DNA-skade og reparasjonsinkubasjonstid. På grunn av mangel på tid ble ikke eksperimentet gjentatt.

Indusert skadenivå i dette eksperimentet var betydelig høyere i testikkelceller fra neonatale mus enn fra kjønnsmodne mus (figur 3.7). Eksponerte celler fra kjønnsmodne mus har et nivå på 35-40 % DNA-skade ved t=0, mens DNA-skade i cellene fra neonatale mus er hele 55 % ved samme tidspunkt. Nivået av indusert DNA-skade i dette eksperimentet stemmer overens med nivået av indusert skade i eksperimentene med anrikede spermatogonie – og sertolicellesuspensjoner (se figur 3.5). De ueksponerte cellene fra neonatale mus har lavt bakgrunnsnivå av DNA-skade.

Nedgangen i DNA-skade i løpet av reparasjonsinkubasjonstiden på fem timer er betydelig større i celler fra neonatale mus enn celler fra kjønnsmoden mus. I testikkelceller fra kjønnsmoden mus er det en tydelig økning i bakgrunnsskade i form av enkelttrådbrudd og alkalilabile seter fra t=0 til t=5. I testikkelceller fra kjønnsmoden mus inkubert ved 20 % O₂ er det mer total skade etter fem timer inkubasjonstid enn før. Det samme gjelder de ueksponerte testikkelcellene fra kjønnsmoden mus ved begge oksygenkonsentrasjoner (se figur 3.7).

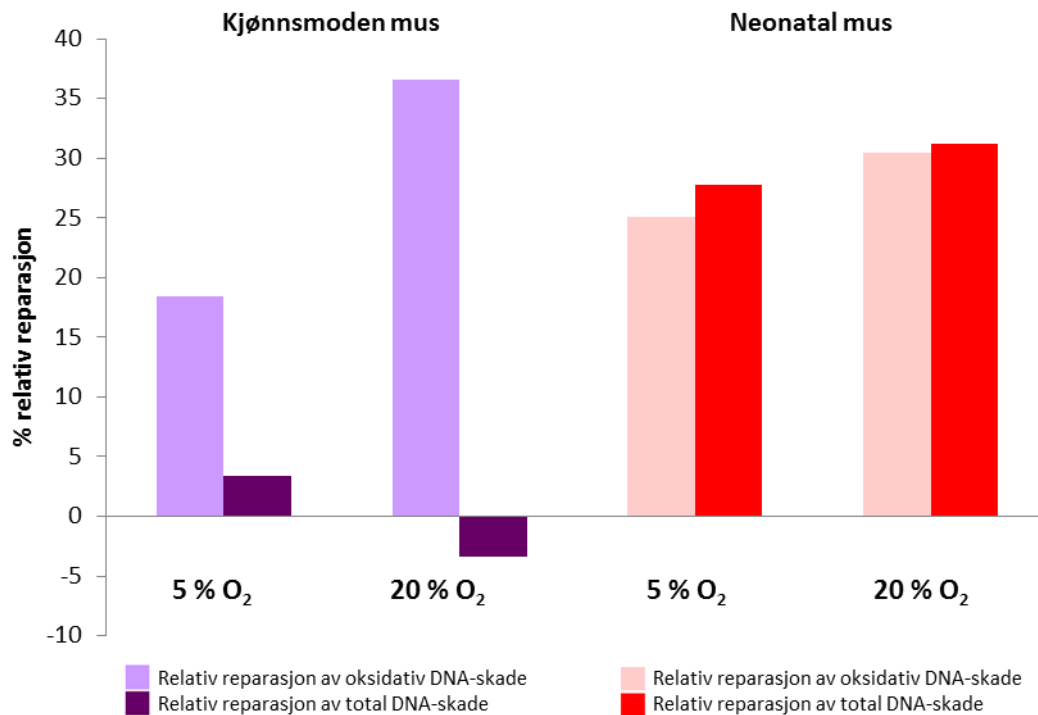


Figur 3.7 DNA-reparasjon av induerte oksidative skader i blandete testikkelcellesuspensjoner fra kjønnsmoden mus og neonatale mus inkubert ved 5 % eller 20 % O₂. Testikkelceller fra neonatale og kjønnsmoden mus ble eksponert for oksidativ agens (1 μ m Ro + 3 min lys) med påfølgende inkubasjonsreparasjon i fem timer ved hhv 5 % O₂ og 20 % O₂. Mengde DNA-skade i cellene er vist like etter eksponering (0t) og etter fem timer reparasjonsinkubasjon (5t). Mørk farge representerer enkeltråddbrudd og alkalilabile skader, lys farge representerer oksidative (Fpg-sensitive) DNA-skader. Kontroller er ueksponerte celler. Kun ett eksperiment ble utført.

Reparasjonskapasitet i testikkelceller fra neonatale mus var forholdsvis lik ved 5 % og 20 % oksygen, med en relativ reparasjon på 25-30 % av oksidative DNA-skader. Relativ reparasjon av total DNA-skade stemmer overens med nivået på reparasjon

av oksidative DNA-skader ettersom nivået av enkelttråddbrudd og alkalilabile skader var lavt i disse cellene (se figur 3.8).

Skade i form av enkelttråddbrudd og alkalilabile lesjoner økte i løpet av inkubasjonsreparasjonstiden i celler fra kjønnsmoden mus (figur 3.7), spesielt ved 20 % O₂. Den relative reparasjonen av oksidativ DNA-skade i testikkelceller fra kjønnsmoden mus var hhv 18 % (5 % O₂) og 37 % (20 % O₂). Mengde enkelttråddbrudd og alkalilabile DNA-skader øker imidlertid i løpet av inkubasjonstiden og medførte at reparasjon av total DNA-skade var lav eller ikke til stede (se figur 3.8). Den relative reparasjonen av oksidativ DNA-skade var noe høyere i testikkelceller fra neonatale mus enn fra kjønnsmodne mus ved 5 % O₂, men ikke ved 20 % O₂.



Figur 3.8 Relativ DNA-reparasjon i testikkelceller inkubert ved 5 % og 20 % O₂ fra kjønnsmoden og neonatale mus. Mørke søyler representerer relativ reparasjon (%) av total skade (bestående av enkelttråddbrudd, alkalilabile skader og induisert oksidativ skade). Lyse søyler representerer relativ reparasjon (%) av oksidative (Fpg-sensitive) DNA-skader. Kun ett eksperiment ble utført.

4. Diskusjon

Kunnskap om reparasjonsmekanismer i testikkelceller har vært begrenset i lang tid, både på grunn av mangel på gode metoder og fordi isolasjon og kultivering av de ulike stadiene av testikkelceller er utfordrende (Olsen *et al.*, 2005). De siste årene har det kommet mye kunnskap om meiotiske og postmeiotiske testikkelceller, men mindre om deres forløpere. Mens meiotiske og postmeiotiske kjønnsceller er beskyttet av blod-testikkelbarrieren, kan det tenkes at mitotiske spermatogonier er mer utsatte for DNA-skade siden disse ligger utenfor barrieren. Dersom dette stemmer kan spermatogonier gjennom evolusjonen ha utviklet et mer effektivt forsvar mot DNA-skader som beskyttelse mot indre og ytre påvirkning.

Dersom DNA-skade oppstår i spermatogonier og ikke blir reparert innen cellens DNA gjennomgår replikasjon, kan det oppstå mutasjoner som vil følge alle spermceller som dannes fra forløpercellen. For arten kan det derfor være en fordel å eliminere celler ved apoptose i stedet for å reparere for å hindre mutasjoner. Apoptose av skadde premeiotiske kjønnsceller (spermatogonier) kan være kritisk i beskyttelsen av senere generasjoner fra effekter fra ulike eksponeringer (Forand *et al.*, 2009). Ifølge våre litteratursøk er det gjort svært lite arbeid på spermatogonier og sertoliceller fra neonatale dyr og studiet kan regnes som «nybrottsarbeid». Behovet for kunnskap om gonocytter og spermatogonier er stort, siden utviklingen av disse cellene legger grunnlaget for mannens fertilitet resten av livet. Skade på DNA i spermatogonier og støtteceller kan resultere i nedgang i fertilitet. Høy mottakelighet for induksjon av skade eller dårlig evne til DNA-reparasjon i sertoliceller vil gi konsekvenser også for kjønnscellene, siden de ikke får den støtten de trenger for å kunne produsere funksjonelle kjønnsceller. Nettopp derfor har vi sett nærmere på egenskapene til spermatogonier og umodne sertoliceller for å forstå hvordan de responderer ved DNA-skade.

At kjønnscellene og de somatiske cellene isoleres i enkeltcellepopulasjoner og eksponeres *in vitro* er en første tilnærming for å etablere kunnskap om disse celletypene. Primære cellekulturer i løsning kan på grunn av suboptimale kultiveringsforhold ikke avspeile cellenes virkelige egenskaper i respons på DNA-skader. Det er vist at tilstedeværelse av støttevev, spesielt sertoliceller, kan redusere apoptose og øke reparasjonshastigheten av DNA-skade i spermatocytter (Bentley og Working, 1988a; Bentley og Working, 1988b).

Kort oppsummert indikerer resultatene i dette studiet at spermatogonier og sertoliceller er like sensitive for induksjon av oksidative skader ved lav dose. I motsetning til spermatogonier ser sertoliceller ut til å bli akkumulere oksidative DNA-skader ved høyere doser. Videre tyder resultatene på at spermatogonier har bedre reparasjonskapasitet enn umodne sertoliceller, særlig ved lave doser oksidativ skade.

4.1 Induksjon av oksidativ DNA-skade og reparasjonskapasitet

På grunn av eksklusjon av data fra sertoliceller i ett eksperiment på grunn av høy bakgrunnsskade i komet, er data fra tre eksperimenter med spermatogonier og to eksperimenter med somatiske celler presentert.

4.1.1 Induksjon og reparasjon av DNA-skader i spermatogonier

Nivået av indusert oksidativ DNA-skade var relativt likt i både spermatogonier og sertoliceller i de utførte eksperimentene og det ble oppnådd en tydelig dose-responskurve. Induksjon av oksidative DNA-skader i spermatogonier var noe høyere i et av tre eksperimenter, men slike variasjoner må påregnes grunnet flere ulike eksperimentelle forhold, blant annet at cellene er isolert fra dyr med noe ulik alderssammensetning. Induksjonsnivået av oksidativ skade diskuteres videre i relasjon med antioksidantforsvaret i kapittel 4.2.

Resultatene i dette studiet viser at spermatogonier i neonatale mus har aktiv DNA-reparasjon av 8-oksoG. Tidligere arbeid ved vårt laboratorium har vist at meiotiske og postmeiotiske kjønnsceller fra gnagere reparerer den spesifikke skaden effektivt (Olsen *et al.*, 2003). Relativ reparasjon av oksidative DNA-skader i spermatogonier var betydelig høyere i to av de tre eksperimentene. Den dårlige reparasjonen i et av eksperimentene kan skyldes tilstanden til cellene etter isolering, da eksperimentet var teknisk forskjellig fra de andre. Membranintegritetstester og bakgrunnsskade i komet var imidlertid lave og de somatiske cellene ved samme eksperiment oppførte seg normalt.

Spermatogoniene og sertolicellene ser ut til å reparere oksidative DNA-skader dårligere jo høyere eksponeringen er. Dette kan delvis forklares med det økte antallet enkelttråddbrudd ved høyere eksponering, som blir reparert i løpet av inkubasjonsreparasjonstiden (se figur 3.5.). Reparasjonsenzymene kan gå i metning ved høyere eksponeringsdoser og cellene kan indusere apoptose dersom skadenivået blir for høyt. I et studie er det vist at etter eksponering for UVB-stråling hadde spermatogonier type A og B lavere terskel for å indusere apoptose enn meiotiske og postmeiotiske kjønnsceller (Xu *et al.*, 2005). Dette kan indikere at spermatogonier heller igangsetter apoptose enn reparasjon etter betydelige skadenivåer, siden antallet kjønnsceller likevel er så stort og at reparasjon av DNA-skade er risikabel i forhold til alternativet. Når det gjelder oksidativt stress, har Celino *et al.* (Celino *et al.*, 2011) vist at meiotiske og postmeiotiske kjønnsceller i ål er mer sensitive for induksjon av ROS og går i apoptose, men at spermatogonier er mindre sensitive (som følge av høye nivåer SOD). Dette viser hvor ulik respons en celle kan ha på ulike typer skader. Trypanblåtester viste ingen klar reduksjon av cellemembranintegritet i de høyest eksponerte cellene. Cellene ble imidlertid ikke observert over lang nok tidsperiode til å kunne utelukke en viss cytotoxiskitet.

Spermatogoniene undersøkt i dette studiet er en blanding av alle de ulike stadiene fra stamcellespermatogonier type A til de mest differensierte spermatogoniene type B. Det er flere grunner til å tro at toleranse for DNA-skade er forskjellig også innenfor

de ulike stadiene av spermatogonier. Innenfor stadiene av spermatogonier er det påvist at differensierte spermatogonier har lavere terskel for å indusere apoptose enn de ekte stamcellespermatogoniene (Celino *et al.*, 2012; Rube *et al.*, 2011). Celino og kollegaer (Celino *et al.*, 2012) viste at differensierte stadier av spermatogonier var mer sårbare for ROS sammenliknet med ikke-prolifererende spermatogonier i ål. Det var dessverre ikke mulig å skille mellom reparasjonskapasiteten i stamcellespermatogonier og senere stadier av spermatogonier i dette studiet. Det er mulig at reparasjonskapasiteten varierer mellom de ulike stadiene. I min spermatogoniefraksjon er kun en liten andel stamcellespermatogonier.

4.1.2 Induksjon og reparasjon av DNA-skader i umodne sertoliceller

De to teknisk akseptable eksperimentene med sertoliceller viste forholdsvis like nivåer av indusert skade. Ved den høyeste eksponeringen ser sertolicellene ut til å akkumulere oksidativ DNA-skade siden nivået av slik skade er høyere etter fem timer reparasjonsinkubasjon. Den manglende reparasjonen i sertoliceller ved høyest eksponering kan skyldes en generell stressrespons eller en metning av reparasjonskapasiteten. Dette er ikke tilfelle i spermatogonier, som kan tyde på at sertoliceller har lavere terskel for metning av reparasjonskapasiteten enn spermatogonier. Cellene ble ikke observert over lang nok tidsperiode for å kunne si om dette medfører cytotoxiskitet i cellepopulasjonen. Dersom dette er tilfelle i neonatale dyr, vil det ikke bare få følger for sertolicellepopulasjonen, men indirekte også for kjønnscellene. Med svekkede eller redusert antall sertoliceller vil antall kjønnsceller også bli redusert.

Resultatene i dette studiet viser at umodne sertoliceller, i likhet med spermatogonier fra neonatale mus, har aktiv DNA-reparasjon av 8-oksoG. Så langt vi vet er det ikke blitt publisert studier som omhandler reparasjon av oksidative DNA-skader i sertoliceller fra neonatale dyr.

Modningen av sertoliceller spiller en viktig rolle for at testikkelen senere skal kunne produsere spermceller, og gir grunn til å tro at forsvarsmekanismene mot DNA-skader er effektive i den prolifererende populasjonen. I tillegg produserer testikkelcellene i utvikling ROS, og gir grunn til å tro at forsvaret mot oksidativt stress er effektivt (Scarabelli *et al.*, 2011). Det er nylig blitt påvist høyt uttrykk av antioksidantenzymene GST (glutathion-s-transferase), CAT (katalase) og SOD (superoksid dismutase) i aktivt delende sertoliceller fra syv dager gamle rotter, og nivåene ble redusert mot pubertal og kjønnsmoden fase (Scarabelli *et al.*, 2011). I samsvar med nivå av antioksidanter var også nivået av p53 høyt ved dag syv og gikk deretter ned. P53 er ansvarlig for å stoppe cellyklusen når DNA er skadet (Liebermann *et al.*, 2007). Scarabelli og kollegaer foreslår at disse funnene indikerer at ROS-nivået i sertoliceller synker fra fødselen til puberteten. I lys av dette kan en se for seg at høyt nivå av p53 i neonatale sertoliceller indikerer at det er mer effektivt at celler elimineres ved apoptose under prolifereringen dersom første forsvarslinje som består av høye nivåer antioksidantenzymene er suboptimalt i forhold til den genotoksiske dosen. Det kan sees i samsvar med at den høyeste

eksponeringsdosen brukt i min studie kan ha medført cytotoksisitet i sertolicellepopulasjonen dersom cellene hadde blitt observert over lengre tid. Lavere doser av oksidativt stress tolereres imidlertid takket være et forsvar bestående av antioksidanter og et nå påvist funksjonelt reparasjonssystem.

Det er en pågående diskusjon om sertoliceller i kjønnsmodne dyr har funksjonell DNA-reparasjon eller ikke *in vivo*. Ahmed og kollegaer (Ahmed *et al.*, 2009) viste aktiv reparasjon av dobbelttråddbrudd i sertoliceller fra kjønnsmodne dyr *in vitro*. Forfatterne foreslo at reparasjonen ble utført av en nylig oppdaget "non-homologous end-joining" (NHEJ) mekanisme ved bruk av reparasjonsproteiner som vanligvis er involvert i BER. Tilstedeværelsen av BER-proteiner i modne sertoliceller er spesiell sammenliknet med andre somatiske celler i G0-fasen (Ahmed *et al.*, 2009). Tilstedeværelsen av BER-proteiner i sertoliceller i kjønnsmodne dyr kan derfor indikere at sertolicellene også har mekanismer for å utføre BER, i overensstemmelse med våre resultater som viser aktiv reparasjon av 8-oksoG.

4.1.3 Har spermatogonier mer effektiv reparasjon enn støttecellene?

Reparasjonskapasitet av oksidative DNA-skader er som nevnt et lite utforsket område i neonatale spermatogonier og sertoliceller. I samtlige eksperiment har vi vist tydelig doserespons av oksidative skader etter eksponering og nivåene av induert skade i spermatogonier og sertoliceller er forholdsvis like. Det må poengteres at de to celletypene ikke har fått identisk behandling etter anrikningen på lektinskål. Siden spermatogonier forblir i løsningen mens sertoliceller binder seg til overflaten på lektinskålen, gikk sertolicellene gjennom en tøffere behandling før eksponering ved at de ble trypsinert og skrapet av lektinskålen. Bakgrunnsskade i DNA i komet var imidlertid lave i sertoliceller i likhet med spermatogonier, noe som tilsier god genomisk integritet av cellene.

Redusert reparasjonskapasitet av oksidative skader ved høyere eksponeringsdoser kan delvis skyldes en økning i enkelttråddbrudd og alkalilabile skader. Dette gjelder i begge cellepopulasjoner og kun laveste eksponeringsdose er derfor valgt for sammenlikning av reparasjonskapasitet mellom spermatogonier og sertoliceller.

Gjennomsnittlig reparasjon av oksidative skader i løpet av fem timer var ved laveste eksponeringsdose 29,1 % i spermatogonier og 16,5 % i sertoliceller. Spermatogonier viste svært dårlig reparasjon i et av eksperimentene (se figur 3.6) og differansen kan derfor være enda større. Sett bort i fra dette ene eksperimentet viser våre resultater en tydelig mer effektiv reparasjonskapasitet av oksidert DNA i spermatogonier enn i deres støtteceller. Så langt vi vet er det ikke gjort studier av DNA-reparasjon av oksiderte DNA-baser i neonatale testikkelceller som kan støtte opp om dette funnet. Funnet kan sees i relasjon til et studie hvor neonatale testikkelceller fra mus fikk induert dobbelttråddbrudd som følge av stråling (Forand *et al.*, 2009). Sammenlikning av umodne sertoliceller (1 dag etter fødsel) og spermatogonier (8 dager etter fødsel) viste at sertoliceller uttrykte et lavere nivå av proteiner inkludert i reparasjon av dobbelttråddbrudd sammenliknet med spermatogonier. Det må poengteres at

reparasjon av dobbelttråddbrudd er vesentlig forskjellig fra responsmekanismen ved oksiderte baser.

Reparasjonskapasiteten som er vist i de anrikede cellepopulasjonene kan være forskjellig fra det som skjer *in vivo* fordi spermatogonier og sertoliceller utgjør et intimt forhold i stamcellenissen. I studiet med redusert oksygen ble en blandet testikkelcellesuspensjon fra neonatale mus brukt for å studere induksjon og reparasjon av oksidativ skade. Den blandede testikkelcellesuspensjonen viste en relativ reparasjon på 25-30 % av induert oksidativ skade (se figur 3.8), mens reparasjonen i studiene med anrikede spermatogonier varierte fra ingen reparasjon til 18,6 % og 29,2 % ved samme eksponeringsdose (3 min lys) (se figur 3.6). I eksperimentet med blandet cellesuspensjon var imidlertid celletettheten i prøven lavere enn i eksperimentene med anrikede celler. Dersom celletetthet og volum av prøvene i eksperiment med blandede testikkelceller hadde vært optimale kan reparasjonskapasiteten ha vært annerledes dersom spermatogonier og sertoliceller trives best i nærvær av hverandre, i likhet med det som er vist for spermatocytter og sertoliceller (Bentley og Working, 1988a; Bentley og Working, 1988b).

4.2 Uttrykk av antioksidantenzymet Cu/Zn SOD i testikkelceller

For å karakterisere forsvaret mot oksidativt stress i spermatogonier og deres støtteceller fra neonatale mus, så vi nærmere på antioksidantenzymet Cu/Zn SOD, som antas å være en del av det primære forsvaret mot ROS. I studiet induerte vi ROS i form av superoksidradikaler ved eksponering for Ro 12-9786 og lys. SOD (superoksid dismutase) er hovedsakelig et forsvar mot superoksidradikaler og dersom den ene celletypen har lavere nivå av SOD, kan det komme til uttrykk som høyere sensitivitet for eksponeringen. Et høyt uttrykk av Cu/Zn SOD kan indikere et generelt høyere antioksidantforsvar mot ROS hos celletypen(e).

De anrikede spermatogonie – og sertolicellefraksjonene ble farget med antistoff mot Cu/Zn SOD. Celler i begge preparater uttrykte varierende nivåer av Cu/Zn SOD, men det var ikke mulig å kvantifisere mengden av Cu/Zn SOD i de to celletypene. Spermatogoniepreparatene så imidlertid ut til å ha noe flere av de mest intenst fargede celler enn sertolicellepreparatene, men observasjonen må forfølges. I og med at cellepreparatene er en blanding av celler til tross for anrikning, er det vanskelig og si noe om hver celletype uten å farge med en ekstra markør for identifikasjon av celletypene.

Det er vist at aktiviteten av SOD i rotter varierer med modningen i testikkelen (Peltola *et al.*, 1992) og at uttrykket av Cu/Zn SOD i menneskets testikkel er høyt i spermatogonier, men lavere i modne sertoliceller, spermatocytter og senere stadier av kjønnsceller (Nonogaki *et al.*, 1992). Videre viste Celino og kollegaer (Celino *et al.*, 2011) at spermatogonier i japansk ål har mer Cu/Zn SOD enn meiotiske og postmeiotiske kjønnsceller (*in vitro*, organkultur). Etter induksjon av oksidativt stress ble det observert oksidativ skade (8-oksoG) og apoptose i meiotiske og postmeiotiske kjønnsceller, men ikke i spermatogonier, som tilsier at spermatogonier

er mer resistente mot ROS. Celino og kollegaer indikerer at tilstedeværelsen av høye nivåer av Cu/Zn SOD og Zn gjør spermatogonier mer resistente for ROS (Celino *et al.*, 2011). Det er vist høyt uttrykk av SOD også i neonatale sertoliceller fra rotte (Scarabelli *et al.*, 2011) sammenliknet med den modne sertolicellen. I videre arbeid kan uttrykk av Cu/Zn SOD i testikkelceller fra neonatale celletyper sammenliknes med differensierte stadier av cellene fra kjønnsmodne mus for å undersøke om tilsvarende gjelder for mus.

Så langt vi vet er det ikke blitt gjort en sammenlikning av Cu/Zn SOD-nivå på tvers av celletypene, som er undersøkt i denne oppgaven. Som forklart ovenfor er det studier som viser at nivået av antioksidantforsvaret i både spermatogonier og sertoliceller fra neonatale dyr er høyere i forhold til cellene i kjønnsmodne dyr. Det er derfor sannsynlig at det generelle forsvaret mot ROS er høyere i yngre dyr og differansen mellom de ulike celletypene bør undersøkes nærmere for å kunne si noe om hvilke celletyper som er best rustet mot oksidativt stress i neonatale dyr. Ved å se på induisert skadenivå i spermatogonier og sertoliceller i kometmetoden ser det ut som celletypene har lik sensitivitet for induksjon av oksidativ skade. Det kan indikere at uttrykk av Cu/Zn SOD også er forholdsvis likt, men celletypene har som nevnt tidligere flere forsvarsmekanismer mot ROS som kan jevne ut et eventuelt lavere nivå av Cu/Zn SOD i en av celletypene.

4.3 Trives testikkelceller best i miljøer med redusert oksygen?

Tidligere publiserte studier (Olsen *et al.*, 2003) har vist raskere reparasjon av 8-oksoG-lesjoner i testikkelceller fra rotte enn det som ble observert i mine studier. Da Olsen og kollegaer (Olsen *et al.*, 2003) eksponerte testikkelceller fra rotte for samme type eksponering rapporterte de en reparasjon av alle oksidative skader innen to timer i primære spermatocytter og runde spermatider. Sammenlikningsgrunnlaget med studiet til Olsen (Olsen *et al.*, 2003) er ikke optimal, da eksponeringsdosen var høyere (3 μ m Ro 12-9786, 5 min lys) samt at celletetthet og volum var mer optimalt og isoleringsprosessen tilpasset kjønnsmodne dyr. Inkubasjonen av cellene var ved dette eksperimentet i likhet med flere eksperiment ved 20 % O₂. Siden cellene i min studie inkuberes ved redusert oksygen for å etterlikne cellenes naturlige miljø, var det derfor interessant å se nærmere på om oksygeninnholdet påvirker reparasjonskapasiteten i testikkelceller. Det er vist at primære testikkelceller har redusert viabilitet og økt DNA-skade når de inkuberes over lengre tidsperioder ved 20 % O₂ (Erkkila *et al.*, 1999). Testikkelceller fra både neonatale og kjønnsmodne mus ble inkludert i studiet for å kunne sammenlikne induksjon av skade og reparasjonskapasiteten mellom spermatogonier og differensierte kjønnsceller. Somatiske celler ble ikke ekskludert fra celsuspensjonene og ifølge våre erfaringer vil denne celletypen utgjøre ca. 50 % av suspensjonen fra neonatale dyr og ca. 10 % av suspensjonen fra kjønnsmodne dyr, i tillegg til at de har ulik differensiering.

Når det gjelder induksjon av oksidativ DNA-skade i neonatale og kjønnsmodne mus, var vår hypotese at testikkelceller fra neonatale dyr har et mer robust forsvar mot ROS enn testikkelceller fra kjønnsmodne mus. Dette er i samsvar med påviste høye

nivåer av Cu/Zn SOD i spermatogonier i japansk ål (Celino *et al.*, 2011) og i sertoliceller fra nyfødte mus (Scarabelli *et al.*, 2011). Nivået av induserte oksidative skader var imidlertid betydelig høyere i celler fra neonatale dyr enn i testikkelceller fra kjønnsmodent dyr, men det må poengteres at disse resultatene er basert på et enkeltstående eksperiment. I vår analyse av testikkelceller fra kjønnsmoden mus kan det ha blitt inkludert analyse av kjønnsceller fra stadier etter runde spermatider. Disse sene stadiene er mindre mottakelig for skade fordi DNAet er pakket tettere sammen og DNA-reparasjon er mangelfull. Dette kan delvis forklare den observerte høyere resistansen i testikkelceller fra kjønnsmoden mus.

Siden skade i form av enkelttråddrudd og alkalielabile lesjoner økte i løpet av inkubasjonsreparasjonstiden i celler fra kjønnsmoden mus, et tegn på at cellene ikke har det bra, er det vanskelig å si om resultatene avspeiler reparasjonskapasiteten på en forsvarlig måte. Siden det var så lite tilgjengelig vev fra neonatale testikler, ble prøvene fra kjønnsmoden testikkel redusert til samme lave celletetthet som prøvene fra neonatale mus. Det kan ha medført suboptimale kultiveringsforhold for cellene. Kjønnsceller i sene differensieringsstadier kan også ha bidratt til å redusere reparasjonskapasiteten til populasjonen.

Reparasjonen av oksidative DNA-skader i testikkelceller fra kjønnsmodne mus ser likevel ut til å være høyere ved 20 % O₂ enn ved 5 % O₂. En forklaring på økt reparasjon ved 20 % O₂ kan være at cellene blir mer stresset i miljøet med høyt oksygeninnhold som kan føre til induksjon av reparasjon. Reparasjonskapasiteten i testikkelceller fra neonatale dyr er kun noen få prosent høyere ved 20 % enn 5 %, og det kan derfor se ut som at testikkelceller fra kjønnsmoden mus er mer påvirket av endring i oksygeninnhold enn neonatale dyr. En fysiologisk forklaring kan være at differensierte kjønnsceller befinner seg innenfor blod-testikkelbarrieren hvor det er lavere oksygeninnhold enn utenfor (Reyes *et al.*, 2012). Siden eksperimentet kun er utført én gang skal man imidlertid være forsiktig med å tolke for mye ut av dataene.

4.4 Metodiske betraktninger

En betydelig utfordring ved eksperimentene med neonatale dyr var celleutbyttet. Det ble satt opp 4-8 avlstrioper og utbyttet var aldri mer enn 10 hannmus på forsøksdagen. Fra én 5-7 dager gammel mus var utbyttet omtrent 0,5 millioner celler. Et alternativ til å øke antall mus i oppsettet kunne ha vært å ha færre prøver på bekostning av eventuelle viktige kontroller eller en tydelig dose-respons. Med en celletetthet på 1-2 millioner celler pr ml ville forutsetningene for et optimalt kultiveringsforhold ha vært bedre enn tettheten vi praktiserte med (0,5-0,7 millioner celler pr ml etter anrikning). For å kunne utføre eksperimentet med nødvendige kontrollprøver og eksponeringsdoser for å oppnå en dose-respons, ble volum pr prøve kun 70-100 µl ved reparasjonsinkubasjon. Miljøsvingninger i pH, temperatur og oksygen vil være raskere i små volum. Medium med Hepes ble derfor benyttet for å minimalisere svingning i pH. Videre utfordringer på grunn av små volum var de mange nedspinninger og resuspensjoner metoden krevde for å vaske bort enzymer og

kjemikalier. Resuspensjon måtte utføres forsiktig for å unngå å skade cellene, samt at oksygen ikke måtte tilføres løsningen ved pipettering.

4.4.1 Celleintegritet

Erfaringer fra dette prosjektet har vist at spermatogonier og sertoliceller er svært utfordrende å jobbe med, da de er skjøre og har lav terskel for å få skadet cellemembranene, noe man kan forstå ut i fra både viabilitetstester samt varierende resultater i kometmetoden. Erfaringene viste også at cellene bør oppbevares ved romtemperatur for å unngå «stive» membraner ved membranintegritetstester. Trypanblå eksklusjonstest måler membranintegritet, som kan være redusert grunnet andre årsaker enn cytotoksisitet, for eksempel pipettering eller sentrifugering (Collins *et al.*, 2008). Derfor har utfallet av ubehandlede celler (negative kontrollprøver) i komet blitt vektlagt i de presenterte studiene. Variabiliteten i våre resultater førte til en diskusjon om den massive apoptosen i den første bølgen av spermatogenese påvirket cellesuspensjonens viabilitet. Det er imidlertid hyppigere spontan apoptose fra dag 8-22 etter fødsel (30 %) enn tiden før dag 8 og etter dag 22, frem mot kjønnsmodning (10 %) (Mori *et al.*, 1997).

To eksperimenter ble ikke vurdert i oppgaven fordi medianen i samtlige prøver, også ubehandlede celler, viste mer enn 80 % DNA-skade i kometmetoden. Den eneste forskjellen fra de presenterte eksperimentene med lav bakgrunnsskade er innføring av ny laktat til bruk i RPMI medium og det er ikke grunn til å tro at laktat i slik konsentrasjon skal være toksisk.

Dersom cellene er apoptotiske før innstøpning til komet, kan man tenke seg at de opphakkede DNA-fragmentene forsvinner under elektroforesen eller at de fremstår (i tidlig apoptotisk fase)som "ghosts" (en sky av hale uten hode) ved kometavlesning, hvilket er lite sannsynlig (Collins *et al.*, 2008). Det var imidlertid veldig få "ghosts" i våre prøver. Generelt sett, kan den reduserte haleintensiteten målt ved $t=5$ kontra $t=0$ skyldes at noen celler var apoptotiske og at det derfor ble analysert flere celler med mindre skader ved $t=5$. For å avkrefte dette ble PI/Hoechst-farging utført for og bl.a. observere apoptotiske celler. Det ble ikke observert tydelige apoptotiske celler (resultater ikke vist), men det var utfordringer forbundet med PI-preparatene, som gjør at det bør undersøkes ytterligere ved bruk av andre metoder. Dersom cellene var nekrotiske vil de sannsynligvis forsvinne i et av vasketrinnene før innstøpning til komet.

4.4.2 Isolering av celler

Metoden som ble brukt for å isolere celler fra 5-7 dager gamle mus ble modifisert og optimalisert underveis i dette studiet da vi ikke hadde kjennskap til disse cellene fra før. Isoleringsprosessen var krevende og det faktum at cellene høstes fra neonatale dyr kan også være årsak til at cellene var svært sårbare. Det ble brukt RPMI medium (+/- FCS) under isolering og eksponering og Stem Pro medium til inkubasjonen etter eksponeringen for å optimalisere forholdene for spermatogonier. Bytte av cellemedium er ikke optimalt for cellenes funksjon. Nylige publiserte data på

optimalisering av kultivering av testikkelceller viser at valg av medium med eller uten serum har mye å si for proliferering og differensiering av gonocytter/spermatogonier til modne haploide kjønnsceller (Sato *et al.*, 2011). Ved bruk av serumfritt medium tilsatt knockout serum replacement (KSR) så faktoren bovin serum albumin (BSA) ut til å være kritisk for dannelse av haploide kjønnsceller fra spermatogonier, dvs at funksjonalitet av cellene ble opprettholdt.

4.4.3 Anrikning av spermatogonier og sertoliceller

Tidligere masterstudent ved samme laboratorie (Maass, 2008) fant optimal inkubasjonstid på lektinskål for å oppnå størst andel spermatogonier i løsning på testikkelceller fra rotte. Inkubasjonen på lektinskål foregikk i én time ved 32 °C, 5 % CO₂ og 5 % O₂. I starten av min studie ble cellene inkubert på lektinskål direkte etter isoleringen av cellene, og cellene bandt seg dårligere enn forventet. Ved å la cellene stå i rør (med korken løst på) i inkubatorskapet i én time etter den enzymatiske isoleringen fikk de tid til å restituere. Trypsinkonsentrasjonen brukt i isolasjon av celler ble i tillegg titrert for å finne optimal konsentrasjon uten å gi vesentlig lavere celleutbytte. Dette fordi trypsin kan "spise" på overflatemolekylene til cellene, som kan gjøre at de ikke binder seg til lektin. Det ble besluttet å redusere trypsinkonsentrasjonen med 33 % fra opprinnelig metode siden noe flere celler så ut til og feste seg på lektinskålen og celleutbyttet etter anrikning var uendret. Etter flere eksperimenter med dårlig seleksjon ble lektin fra *Phaseolus vulgaris* erstattet av lektin fra *Datura Stramonium* som skulle være effektiv ifølge Scarpino *et al.* (Scarpino *et al.*, 1998). Siden optimal celletetthet ved lektinseleksjon var $1,5 \times 10^5$ celler/cm² fra prepubertale rotter (Scarpino *et al.*, 1998) brukte vi i samtlige eksperiment kun én lektinskål (60 mm) da vårt totale antall celler før seleksjon var 4-4,5 millioner celler. Som følge av erfaring ble det satt en grense på én uke fra tillaging til bruk av lektinskålene.

Metoden for å løsne adherente celler fra lektinskålen ble forsøkt optimalisert. Cellene bandt seg sterkere til overflaten enn andre typer celler vi er vant med og trypsinering i 1-2 min ved 32 °C løsnet ikke cellene. Til tross for en økning til 6-7 minutter inkubasjon med trypsin ved 37 °C (Scarpino *et al.*, 1998) var ikke metoden effektiv og cellene måtte skrapes av etter trypsinering. Ved forsøk C ble det forsøkt å skrape cellene direkte av skålen uten trypsinering på forhånd. Etter 5 timer reparasjon hadde størsteparten av cellepopulasjonen mer enn 80 % DNA-skade detektert i komet. I tillegg var det kun 10 % av cellene som ekskluderte trypanblått i membranintegritetstesten. Det er derfor sannsynlig at cellene ikke tåler å bli skrapet av lektinskålen uten og på forhånd ha blitt delvis løsnet under trypsinering. For å sikre like betingelser for begge celletyper etter anrikning, kunne cellene ha blitt selektert annerledes. Cellesuspensjonen kan deles i to prøver som selekteres hhv. på lektin og laminin, som binder spermatogonier. Tidligere erfaringer med laminin (Maass, 2008) ga imidlertid ikke like god anrikning av testikkelceller fra rotte som ved bruk av lektin.

4.4.4 Karakterisering av spermatogonier og sertoliceller

Flere ulike fikseringer ble utprøvd for farging med antistoff mot vimentin. Fiksering med metanol ved -80 °C ga best resultater ved farging for vimentin, men på grunn av at cellene klumpet seg sammen på preparatene ble det vanskelig å telle. Cellene ble derfor fiksert i etanol og 0,1 % PFA.

Årsaken til at den enzymatiske isoleringen av testikkelceller og seleksjon av spermatogonier ble valgt er at det i litteraturen meldes om høy ratio av kjønnsceller i forhold til sertoliceller (Kanatsu-Shinohara og Shinohara, 2010). I tillegg viser data fra tidligere masterstudent (Maass, 2008) 68 % spermatogonier i suspensjon etter isolering av testikkelceller fra prepubertale rotter. I dette studiet var andelen somatiske celler (sertoli) i suspensjonen $47,5 \pm 3,1$ % etter isolasjon av testikkelceller. Det er imidlertid litteratur som rapporterer et annet forhold mellom kjønnsceller og somatiske celler ved dag 5 og 10 etter fødsel i mus (ca. 1:10) (Auharek og de Franca, 2010). Flere cellemarkører burde vært inkludert for å bestemme endelig forhold mellom de ulike celletypene. Titrering av en positiv markør for spermatogonier (CD9) (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2004) ble foretatt, men på grunn av få celler tilgjengelig for fiksering ble ikke metoden for farging mot CD9 optimalisert. Det var også ønskelig å farge for Cu/Zn SOD parallelt med en positiv markør for spermatogonier (CD9), men ved utprøving på testikkelsuspensjon fra kjønnsmoden mus ga kombinasjonen av våre antistoff mot Cu/Zn SOD og CD9 kryssreaksjoner.

4.5 Konklusjoner

Hovedmålet for denne oppgaven var å bidra til god reproduktiv helse, ved å avklare mekanismer som har betydning for DNA-skader i testikkelceller. Bedre mekanismeforståelse vil bidra til dette målet. Vi har derfor søkt å etablere økt kunnskap om testikulære spermatogonier (deriblant stamceller) og støttceller (sertoliceller) i neonatale dyr.

- Det ble etablert en metode for isolering av testikkelceller fra neonatale mus med påfølgende separasjon og anrikning av separate kulturer av neonatale spermatogonier og sertoliceller. Sertolicellene ble identifisert vha immunfarging mot vimentin som kunne påvise en renhet av spermatogonier på opptil 80 %.
- Ved immunfarging mot Cu/Zn SOD ble uttrykk av antioksidanten påvist med ulik intensitet i både spermatogonie – og sertolicellefraksjon, men nivået ble ikke kvantifisert.
- Oksidative DNA-skader ble målt i neonatale spermatogonier og sertoliceller ved hjelp av kometmetoden. Cellepopulasjonene hadde lav bakgrunnsnivå av både enkelttrådbrudd, alkalilabile DNA-skader og oksidative DNA-skader målt med kometmetoden. Spermatogonier og sertoliceller var tilnærmet like mottakelige for oksidative DNA-skader i lave doser. I motsetning til spermatogonier, akkumulerte sertolicellene oksidative DNA-skader under

inkubasjonstiden ved høyere doser. Den manglende reparasjonen i sertoliceller ved høyest eksponering kan skyldes en generell stressrespons eller en metning av reparasjonskapasiteten.

- Reparasjonskapasiteten ble målt som gjenværende DNA-skader, ved at de forskjellige celletypene ble inkubert i fem timer etter genotoksisk behandling. Spermatogonier viste mer effektiv reparasjon av oksidert DNA enn sertoliceller, særlig ved laveste eksponeringsdose. Det betyr at spermatogonier i neonatale dyr har funksjonell og effektiv reparasjon av oksidative DNA-skader, noe som bidrar til å redusere risikoen for induksjon av mutasjoner eller celletap, som kan gi konsekvenser for resten av hannens fertile liv. Den andre celletypen som ble studert i dette studiet, sertolicellen, deler seg hyppig i neonatale dyr for å etablere en moden cellepopulasjon til støtte for kjønnscellene. Dersom våre observasjoner av lavere reparasjonskapasitet i sertoliceller kan medføre redusert viabilitet eller funksjonelle forstyrrelser i sertolicellepopulasjonen over tid, kan dette medføre negative konsekvenser også for utvikling av kjønnsceller.

4.6 Videre arbeid

Ekstrapolering av resultater fra testikkelceller hos gnagere til testikkelceller hos mennesket bør gjøres med stor forsiktighet, siden det er vist at testikkelcellenes reparasjonskapasitet og metabolsk hastighet har vesentlige ulikheter mellom artene. Siden 8-oksoG repareres effektivt i meiotiske og postmeiotiske kjønnsceller hos gnagere, men svært ineffektivt i mennesket, kan det medføre feilaktige konklusjoner. Kartlegging av eventuelle forskjeller mellom gnagere og mennesket i spermatogonier og sertoliceller er nødvendig for å etablere om slike forskjeller er tilstede også i disse celletypene.

Som nevnt har spermatogoniene et svært intimt forhold til sertolicellene som fungerer som støtteceller og gir både næring og signaler for celleoverlevelse og celledød. At kjønnscellene og de somatiske cellene isoleres i enkeltcellepopulasjoner og eksponeres *in vitro* var en første tilnærming for å etablere kunnskap om disse celletypene, men det er ikke optimale betingelser. Primære cellekulturer i løsning kan på grunn av suboptimale kultiveringsforhold ikke avspeile cellenes virkelige egenskaper i respons på DNA-skader. Det er vist at tilstedeværelse av støttevev, spesielt sertoliceller, kan redusere apoptose og øke reparasjonshastigheten av DNA-skade i spermatocytter (Bentley og Working, 1988a; Bentley og Working, 1988b). Det er grunn til å tro at anrikning av spermatogonier og sertoliceller gjør cellene svært sårbare og at en *in vivo* tilnærming ville ha vært gunstigere. Vi ønsker derfor å etablere og studere responsen til neonatale testikkelceller i et miljø som reflekterer *in vivo* situasjonen; celler kan enten kultiveres i sædrørene *in situ* eller sammen med sertoliceller i suspensjon. Cellene kan eksponeres og kultiveres for å tillate DNA-reparasjon mens de forblir i sædrøret og deretter kan DNA-skader måles med kometmetoden. For å undersøke om celletypene har ulikt nivå av DNA-skade og

reparasjonskapasitet måtte sertolicellene ha blitt separert fra kjønnscellene i ettertid. Med en spesifikk spermatogoniemarkør kunne magnetisk celledatering basert på overflatemarkører ha trukket spermatogonier ut av løsningen. Kanatsu-Shinohara (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2012) har nylig presentert en ny metode for anrikning av spermatogoniale stamceller fra kjønnsmodne mus. Melanoma cell adhesion molecule (MCAM) ble funnet å være spesifikt uttrykt i spermatogoniale stamceller og kan anrikes ved fluorescensaktivert celledatering. Griswold og Oatley (Griswold og Oatley, 2012) har også identifisert en lovende markør som kan skille ekte stamcellespermatogonier fra andre spermatogonier, ID4. En slik tilnærming ville gitt resultater som er mer fysiologisk relevante.

Referanseliste

- Ahmadi, A., og Ng, S. C. (1999). Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool.* **284**, 696-704.
- Ahmed, E. A., Barten-van Rijbroek, A. D., Kal, H. B., Sadri-Ardekani, H., Mizrak, S. C., van Pelt, A. M., og de Rooij, D. G. (2009). Proliferative activity in vitro and DNA repair indicate that adult mouse and human Sertoli cells are not terminally differentiated, quiescent cells. *Biol Reprod.* **80**, 1084-1091.
- Auharek, S. A., og de Franca, L. R. (2010). Postnatal testis development, Sertoli cell proliferation and number of different spermatogonial types in C57BL/6J mice made transiently hypo- and hyperthyroidic during the neonatal period. *J Anat.* **216**, 577-588.
- Bentley, K. S., og Working, P. K. (1988a). Activity of germ-cell mutagens and nonmutagens in the rat spermatocyte UDS assay. *Mutat. Res* **203**, 135-142.
- Bentley, K. S., og Working, P. K. (1988b). Use of seminiferous tubule segments to study stage specificity of unscheduled DNA synthesis in rat spermatogenic cells. *Environ Mol Mutagen.* **12**, 285-297.
- Bjorge, C., Wiger, R., Holme, J. A., Brunborg, G., Andersen, R., Dybing, E., og Soderlund, E. J. (1995). In vitro toxicity of 1,2-dibromo-3-chloropropane (DBCP) in different testicular cell types from rats. *Reprod. Toxicol* **9**, 461-473.
- Boekelheide, K., Fleming, S. L., Johnson, K. J., Patel, S. R., og Schoenfeld, H. A. (2000). Role of Sertoli cells in injury-associated testicular germ cell apoptosis. *Proc Soc Exp Biol Med* **225**, 105-115.
- Boffetta, P., Tredaniel, J., og Greco, A. (2000). Risk of childhood cancer and adult lung cancer after childhood exposure to passive smoke: A meta-analysis. *Environ Health Perspect* **108**, 73-82.
- Borg, C. L., Wolski, K. M., Gibbs, G. M., og O'Bryan, M. K. (2010). Phenotyping male infertility in the mouse: how to get the most out of a 'non-performer'. *Hum Reprod. Update* **16**, 205-224.
- Bradley, M. O., og Dysart, G. (1985). DNA single-strand breaks, double-strand breaks, and crosslinks in rat testicular germ cells: measurements of their formation and repair by alkaline and neutral filter elution. *Cell Biol Toxicol* **1**, 181-195.
- Brunborg, G., Holme, J. A., og Hongslo, J. K. (1995). Inhibitory effects of paracetamol on DNA repair in mammalian cells. *Mutat. Res* **342**, 157-170.
- Celino, F. T., Yamaguchi, S., Miura, C., Ohta, T., Tozawa, Y., Iwai, T., og Miura, T. (2011). Tolerance of spermatogonia to oxidative stress is due to high levels of Zn and Cu/Zn superoxide dismutase. *PLoS One* **6**, e16938.

- Celino, F. T., Yamaguchi-Shimizu, S., Miura, C., og Miura, T. (2012). Proliferating Spermatogonia Are Susceptible to Reactive Oxygen Species Attack in Japanese Eel (*Anguilla japonica*). *Biol Reprod.* **87**, 70.
- Chiarini-Garcia, H., Raymer, A. M., og Russell, L. D. (2003). Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. *Reproduction* **126**, 669-680.
- Chiarini-Garcia, H., og Russell, L. D. (2001). High-resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia. *Biol Reprod.* **65**, 1170-1178.
- Collins, A. R., Osoz, A. A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C. C., og Stetina, R. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* **23**, 143-151.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., og Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* **17**, 1195-1214.
- Cordier, S. (2008). Evidence for a role of paternal exposures in developmental toxicity. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **102**, 176-181.
- David, S. S., O'Shea, V. L., og Kundu, S. (2007). Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* **447**, 941-950.
- De Bont, R., og Van Larebeke, N. (2004). Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* **19**, 169-185.
- de Rooij, D. G. (1998). Stem cells in the testis. *Int J Exp Pathol.* **79**, 67-80.
- de Rooij, D. G. (2009). The spermatogonial stem cell niche. *Microsc. Res Tech* **72**, 580-585.
- de Rooij, D. G., og Griswold, M. D. (2012). Questions about Spermatogonia Posed and Answered Since 2000. *J Androl* **Prepubl.**
- de Rooij, D. G., og Russell, L. D. (2000). All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl* **21**, 776-798.
- Drumond, A. L., Meistrich, M. L., og Chiarini-Garcia, H. (2011). Spermatogonial morphology and kinetics during testis development in mice: a high-resolution light microscopy approach. *Reproduction* **142**, 145-155.
- Duale, N., Olsen, A. K., Christensen, T., Butt, S. T., og Brunborg, G. (2010). Octyl methoxycinnamate modulates gene expression and prevents cyclobutane pyrimidine dimer formation but not oxidative DNA damage in UV-exposed human cell lines. *Toxicol Sci* **114**, 272-284.
- Dym, M., og Clermont, Y. (1970). Role of spermatogonia in the repair of the seminiferous epithelium following x-irradiation of the rat testis. *Am J Anat.* **128**, 265-282.

- Erkkila, K., Pentikainen, V., Wikstrom, M., Parvinen, M., og Dunkel, L. (1999). Partial oxygen pressure and mitochondrial permeability transition affect germ cell apoptosis in the human testis. *J Clin Endocrinol. Metab* **84**, 4253-4259.
- Evans, M. D., Dizdaroglu, M., og Cooke, M. S. (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat. Res* **567**, 1-61.
- Forand, A., Fouchet, P., Lahaye, J. B., Chicheportiche, A., Habert, R., og Bernardino-Sgherri, J. (2009). Similarities and differences in the in vivo response of mouse neonatal gonocytes and spermatogonia to genotoxic stress. *Biol Reprod.* **80**, 860-873.
- Free, M. J., Schluntz, G. A., og Jaffe, R. A. (1976). Respiratory gas tensions in tissues and fluids of the male rat reproductive tract. *Biol Reprod.* **14**, 481-488.
- Gocke, E., Chetelat, A. A., Csato, M., McGarvey, D. J., Jakob-Roetne, R., Kirchner, S., Muster, W., Potthast, M., og Widmer, U. (2003). Phototoxicity and photogenotoxicity of nine pyridone derivatives. *Mutat. Res* **535**, 43-54.
- Griswold, M. D. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin. Cell Dev Biol* **9**, 411-416.
- Griswold, M. D., og Oatley, J. M. (2012). Concise Review: Defining Characteristics of Mammalian Spermatogenic Stem Cells. *Stem Cells* **Prepubl.**
- Hansen, S. H., Olsen, A. K., Soderlund, E. J., og Brunborg, G. (2010). In vitro investigations of glycidamide-induced DNA lesions in mouse male germ cells and in mouse and human lymphocytes. *Mutat. Res* **696**, 55-61.
- Hill, R. W., Wyse, G. A., og Anderson, M. (2008). Animal physiology. *Sinauer Associates*, Sunderland.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**, 366-374.
- Hofmann, M. C. (2008). Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche. *Mol Cell Endocrinol.* **288**, 95-103.
- Holstein, A. F., Schulze, W., og Davidoff, M. (2003). Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod. Biol Endocrinol.* **1**, 107.
- Hsu, G. W., Ober, M., Carell, T., og Beese, L. S. (2004). Error-prone replication of oxidatively damaged DNA by a high-fidelity DNA polymerase. *Nature* **431**, 217-221.
- Huckins, C. (1978). Behavior of stem cell spermatogonia in the adult rat irradiated testis. *Biol Reprod.* **19**, 747-760.
- Huckins, C., og Clermont, Y. (1968). Evolution of gonocytes in the rat testis during late embryonic and early post-natal life. *Arch Anat. Histol. Embryol.* **51**, 341-354.

- Huckins, C., og Oakberg, E. F. (1978). Morphological and quantitative analysis of spermatogonia in mouse testes using whole mounted seminiferous tubules. II. The irradiated testes. *Anat. Rec.* **192**, 529-542.
- Ide, H., og Kotera, M. (2004). Human DNA glycosylases involved in the repair of oxidatively damaged DNA. *Biol Pharm Bull.* **27**, 480-485.
- Intano, G. W., McMahan, C. A., Walter, R. B., McCarrey, J. R., og Walter, C. A. (2001). Mixed spermatogenic germ cell nuclear extracts exhibit high base excision repair activity. *Nucleic Acids Res* **29**, 1366-1372.
- Jansen, J., Olsen, A. K., Wiger, R., Naegeli, H., de, B. P., van Der, H. F., Holme, J. A., Brunborg, G., og Mullenders, L. (2001). Nucleotide excision repair in rat male germ cells: low level of repair in intact cells contrasts with high dual incision activity in vitro. *Nucleic Acids Res* **29**, 1791-1800.
- Ji, B. T., Shu, X. O., Linet, M. S., Zheng, W., Wacholder, S., Gao, Y. T., Ying, D. M., og Jin, F. (1997). Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *J Natl. Cancer Inst.* **89**, 238-244.
- Joyce, K. L., Porcelli, J., og Cooke, P. S. (1993). Neonatal goitrogen treatment increases adult testis size and sperm production in the mouse. *J Androl* **14**, 448-455.
- Kanatsu-Shinohara, M., Miki, H., Inoue, K., Ogonuki, N., Toyokuni, S., Ogura, A., og Shinohara, T. (2005). Germline niche transplantation restores fertility in infertile mice. *Hum Reprod.* **20**, 2376-2382.
- Kanatsu-Shinohara, M., Morimoto, H., og Shinohara, T. (2012). Enrichment of Mouse Spermatogonial Stem Cells by Melanoma Cell Adhesion Molecule Expression. *Biol Reprod.*
- Kanatsu-Shinohara, M., og Shinohara, T. (2010). Germline modification using mouse spermatogonial stem cells. *Methods Enzymol.* **477**, 17-36.
- Kanatsu-Shinohara, M., Toyokuni, S., og Shinohara, T. (2004). CD9 is a surface marker on mouse and rat male germline stem cells. *Biol Reprod.* **70**, 70-75.
- Klotz, T., Vorreuther, R., Heidenreich, A., Zumbé, J., og Engelmann, U. (1996). Testicular tissue oxygen pressure. *J Urol.* **155**, 1488-1491.
- Kluin, P. M., og de Rooij, D. G. (1981). A comparison between the morphology and cell kinetics of gonocytes and adult type undifferentiated spermatogonia in the mouse. *Int J Androl* **4**, 475-493.
- Kluin, P. M., Kramer, M. F., og de Rooij, D. G. (1984). Proliferation of spermatogonia and Sertoli cells in maturing mice. *Anat. Embryol. (Berl)* **169**, 73-78.
- Lakså, S. M. B. Effects of environmental exposure: Interplay between helix-distorting and oxidative DNA lesions and their repair. Masteroppgave. 2012. Trondheim, Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet.

- Lieberman, M., Marks, A. D., og Smith, C. M. (2009). Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach. *Lippincott Williams & Wilkins*, Philadelphia.
- Liebermann, D. A., Hoffman, B., og Vesely, D. (2007). p53 induced growth arrest versus apoptosis and its modulation by survival cytokines. *Cell Cycle* **6**, 166-170.
- Lindahl, T. (1974). An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc Natl. Acad. Sci U S A* **71**, 3649-3653.
- Lovell, D. P., og Omori, T. (2008). Statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis* **23**, 171-182.
- Maass, C. Effects of halogenated substances on testicular cells. Masteroppgave. 2008. Oslo, The University of Oslo.
- Marchetti, F., og Wyrobek, A. J. (2005). Mechanisms and consequences of paternally-transmitted chromosomal abnormalities. *Birth Defects Res C Embryo Today* **75**, 112-129.
- Maynard, S., Swistowska, A. M., Lee, J. W., Liu, Y., Liu, S. T., Da Cruz, A. B., Rao, M., de Souza-Pinto, N. C., Zeng, X., og Bohr, V. A. (2008). Human embryonic stem cells have enhanced repair of multiple forms of DNA damage. *Stem Cells* **26**, 2266-2274.
- McCord, J. M., og Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* **244**, 6049-6055.
- McGuinness, M. P., og Orth, J. M. (1992). Reinitiation of gonocyte mitosis and movement of gonocytes to the basement membrane in testes of newborn rats in vivo and in vitro. *Anat. Rec.* **233**, 527-537.
- Morena, A. R., Boitani, C., Pesce, M., De, F. M., og Stefanini, M. (1996). Isolation of highly purified type A spermatogonia from prepubertal rat testis. *J Androl* **17**, 708-717.
- Mori, C., Nakamura, N., Dix, D. J., Fujioka, M., Nakagawa, S., Shiota, K., og Eddy, E. M. (1997). Morphological analysis of germ cell apoptosis during postnatal testis development in normal and Hsp 70-2 knockout mice. *Dev Dyn.* **208**, 125-136.
- Ni, Z. Y., Liu, Y. Q., Shen, H. M., Chia, S. E., og Ong, C. N. (1997). Does the increase of 8-hydroxydeoxyguanosine lead to poor sperm quality? *Mutat. Res* **381**, 77-82.
- Nonogaki, T., Noda, Y., Narimoto, K., Shiotani, M., Mori, T., Matsuda, T., og Yoshida, O. (1992). Localization of CuZn-superoxide dismutase in the human male genital organs. *Hum Reprod.* **7**, 81-85.
- Oakberg, E. F. (1956). Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Am J Anat.* **99**, 507-516.

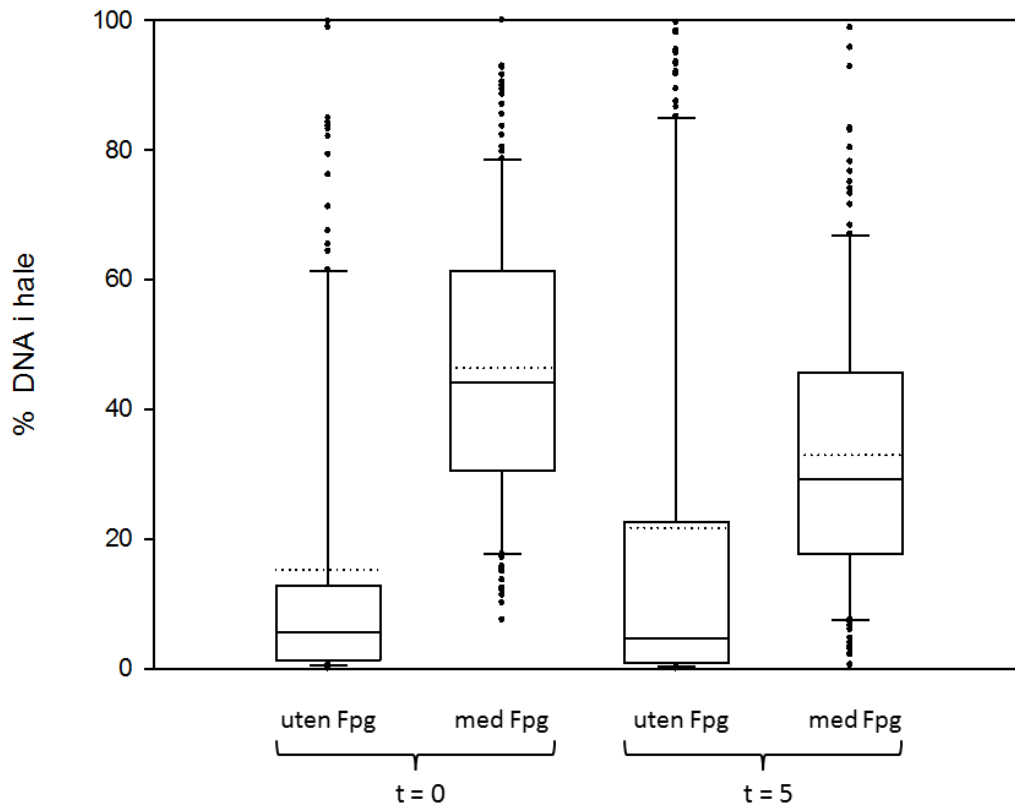
- Olsen, A. K., Andreassen, A., Singh, R., Wiger, R., Duale, N., Farmer, P. B., og Brunborg, G. (2010). Environmental exposure of the mouse germ line: DNA adducts in spermatozoa and formation of de novo mutations during spermatogenesis. *PLoS One* **5**, e11349.
- Olsen, A. K., Bjortuft, H., Wiger, R., Holme, J., Seeberg, E., Bjoras, M., og Brunborg, G. (2001). Highly efficient base excision repair (BER) in human and rat male germ cells. *Nucleic Acids Res* **29**, 1781-1790.
- Olsen, A. K., Duale, N., Bjørås, M., Larsen, C. T., Wiger, R., Holme, J. A., Seeberg, E. C., og Brunborg, G. (2003). Limited repair of 8-hydroxy-7,8-dihydroguanine residues in human testicular cells. *Nucleic Acids Res* **31**, 1351-1363.
- Olsen, A. K., Lindeman, B., Wiger, R., Duale, N., og Brunborg, G. (2005). How do male germ cells handle DNA damage? *Toxicol Appl Pharmacol* **207**, 521-531.
- Orth, J. M., Gunsalus, G. L., og Lamperti, A. A. (1988). Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* **122**, 787-794.
- Ostling, O., og Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys. Res Commun.* **123**, 291-298.
- Paul, C., Murray, A. A., Spears, N., og Saunders, P. T. (2008). A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. *Reproduction* **136**, 73-84.
- Paul, C., Teng, S., og Saunders, P. T. (2009). A single, mild, transient scrotal heat stress causes hypoxia and oxidative stress in mouse testes, which induces germ cell death. *Biol Reprod.* **80**, 913-919.
- Peltola, V., Huhtaniemi, I., og Ahotupa, M. (1992). Antioxidant enzyme activity in the maturing rat testis. *J Androl* **13**, 450-455.
- Petersen, C., og Soder, O. (2006). The sertoli cell-a hormonal target and 'super' nurse for germ cells that determines testicular size. *Horm. Res* **66**, 153-161.
- Reyes, J. G., Farias, J. G., Henriquez-Olavarrieta, S., Madrid, E., Parraga, M., Zepeda, A. B., og Moreno, R. D. (2012). The hypoxic testicle: physiology and pathophysiology. *Oxid. Med Cell Longev.* **Prepubl.**
- Rube, C. E., Zhang, S., Miebach, N., Fricke, A., og Rube, C. (2011). Protecting the heritable genome: DNA damage response mechanisms in spermatogonial stem cells. *DNA Repair (Amst)* **10**, 159-168.
- Russell, L. D., Ettlin, R. A., Hikim, A. P. S., og Clegg, E. (1990). Mammalian Spermatogenesis. In *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis* pp. 1-37. Cache River Press, Clearwater, Florida.

- Sato, T., Katagiri, K., Gohbara, A., Inoue, K., Ogonuki, N., Ogura, A., Kubota, Y., og Ogawa, T. (2011). In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature* **471**, 504-507.
- Scarabelli, L., Lanza, C., Demori, I., Accomando, R., Giansanti, V., Scovassi, A. I., og Palmero, S. (2011). Expression of antioxidant defense and poly(ADP-ribose) polymerase-1 in rat developing Sertoli cells. *Cell Biol Int* **35**, 883-889.
- Scarpino, S., Morena, A. R., Petersen, C., Froyso, B., Soder, O., og Boitani, C. (1998). A rapid method of Sertoli cell isolation by DSA lectin, allowing mitotic analyses. *Mol Cell Endocrinol* **146**, 121-127.
- Schneider, J. E., Price, S., Maidt, L., Gutteridge, J. M., og Floyd, R. A. (1990). Methylene blue plus light mediates 8-hydroxy 2'-deoxyguanosine formation in DNA preferentially over strand breakage. *Nucleic Acids Res* **18**, 631-635.
- Sharpe, R. M., McKinnell, C., Kivlin, C., og Fisher, J. S. (2003). Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* **125**, 769-784.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., og Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* **175**, 184-191.
- Singh, S. R., Burnicka-Turek, O., Chauhan, C., og Hou, S. X. (2011). Spermatogonial stem cells, infertility and testicular cancer. *J Cell Mol Med* **15**, 468-483.
- Sinha Hikim, A. P., og Swerdloff, R. S. (1999). Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod* **4**, 38-47.
- Skakkebaek, N. E., Rajpert-De, M. E., og Main, K. M. (2001). Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* **16**, 972-978.
- Soderlund, E. J., Brunborg, G., Omichinski, J. G., Holme, J. A., Dahl, J. E., Nelson, S. D., og Dybing, E. (1988). Testicular necrosis and DNA damage caused by deuterated and methylated analogs of 1,2-dibromo-3-chloropropane in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* **94**, 437-447.
- Sutovsky, P., og Manandhar, G. (2006). Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. In *The sperm cell* (C.De Jonge og C.Barratt, Eds.), 1 ed., pp. 1-25. Cambridge University Press, New York.
- Tarulli, G. A., Stanton, P. G., og Meachem, S. J. (2012). Is the adult sertoli cell terminally differentiated? *Biol Reprod* **87**, 13-24.
- Tegelenbosch, R. A., og de Rooij, D. G. (1993). A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat. Res* **290**, 193-200.

- Tichy, E. D., Liang, L., Deng, L., Tischfield, J., Schwemberger, S., Babcock, G., og Stambrook, P. J. (2011). Mismatch and base excision repair proficiency in murine embryonic stem cells. *DNA Repair (Amst)* **10**, 445-451.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., og Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* **160**, 1-40.
- Van Loon, A. A., Den Boer, P. J., Van der Schans, G. P., Mackenbach, P., Grootegeod, J. A., Baan, R. A., og Lohman, P. H. (1991). Immunochemical detection of DNA damage induction and repair at different cellular stages of spermatogenesis of the hamster after in vitro or in vivo exposure to ionizing radiation. *Exp Cell Res* **193**, 303-309.
- Van Loon, A. A., Sonneveld, E., Hoogerbrugge, J., Van der Schans, G. P., Grootegeod, J. A., Lohman, P. H., og Baan, R. A. (1993). Induction and repair of DNA single-strand breaks and DNA base damage at different cellular stages of spermatogenesis of the hamster upon in vitro exposure to ionizing radiation. *Mutat. Res* **294**, 139-148.
- Vergouwen, R. P., Jacobs, S. G., Huiskamp, R., Davids, J. A., og de Rooij, D. G. (1991). Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J Reprod. Fertil.* **93**, 233-243.
- Walter, C. A., Intano, G. W., McCarrey, J. R., McMahan, C. A., og Walter, R. B. (1998). Mutation frequency declines during spermatogenesis in young mice but increases in old mice. *Proc Natl. Acad. Sci U S A* **95**, 10015-10019.
- Will, O., Gocke, E., Eckert, I., Schulz, I., Pflaum, M., Mahler, H. C., og Epe, B. (1999). Oxidative DNA damage and mutations induced by a polar photosensitizer, Ro19-8022. *Mutat. Res* **435**, 89-101.
- Wilson, D. M. 3., Sofinowski, T. M., og McNeill, D. R. (2003). Repair mechanisms for oxidative DNA damage. *Front Biosci.* **8**, 963-981.
- Xu, G., Spivak, G., Mitchell, D. L., Mori, T., McCarrey, J. R., McMahan, C. A., Walter, R. B., Hanawalt, P. C., og Walter, C. A. (2005). Nucleotide excision repair activity varies among murine spermatogenic cell types. *Biol Reprod.* **73**, 123-130.
- Yoshida, S., Sukeno, M., og Nabeshima, Y. (2007). A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *Science* **317**, 1722-1726.
- Yoshida, S., Sukeno, M., Nakagawa, T., Ohbo, K., Nagamatsu, G., Suda, T., og Nabeshima, Y. (2006). The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage. *Development* **133**, 1495-1505.
- Zharkov, D. O. (2008). Base excision DNA repair. *Cell Mol Life Sci* **65**, 1544-1565.

Zitzmann, M., Rolf, C., Nordhoff, V., Schrader, G., Rickert-Fohring, M., Gassner, P., Behre, H. M., Greb, R. R., Kiesel, L., og Nieschlag, E. (2003). Male smokers have a decreased success rate for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.* **79**, 1550-1554.

Vedlegg A



Figur A.1 Boksplott som illustrerer variansen i datamaterialet etter induksjon av oksidativ DNA-skade i testikkelceller. Testikkelceller er eksponert for 1 μ m Ro 12-9786 og 1,5 min synlig lys, DNA-skade (% DNA i hale) måles med kometmetoden like etter eksponering (t=0) og etter 5 t reparasjonsinkubasjon. Det spesifikke enzymet Fpg måler den induserte skaden, mens DNA-skade uten Fpg er bakgrunsskade (hovedsakelig enkelttrådbrudd og alkalilabile skader). Medianverdien (hel linje i midten av boksen) er eneste verdi som brukes i analyse i denne oppgaven. Gjennomsnitt er markert med stiptet linje. Nedre linje i boksen viser første kvartil (25 %), median er andre kvartil (50 %) og øverste linje av boksen er tredje kvartil (75 %). Lengden av boksen (IQR) inkluderer 50 % av dataene og linjene som går ut fra boksen strekker seg til største og minste verdi ($< 1,5 \times \text{IQR}$). Sirklene representerer «uteliggere» ($>1,5 \times \text{IQR}$).

Vedlegg B

Løsninger og medier

Collagenaseløsning (100 U/ml)

7,57 mg collagenase type 2 (med aktivitet 330 U/mg) blandes i 25 ml RPMI uten FCS.

Trypsinløsning (20750 U/ml)

6,1029 mg trypsin (med aktivitet 10200 U/mg) blandes i 3 ml RPMI uten FCS.

DNase I-løsning

1 mg DNase blandes i 1 ml RPMI uten FCS.

RPMI medium med FCS

RPMI 1640 tilsatt 10 % FCS, 0,1 mg pyruvat/ml, 5mM DL-Lactic acid, og 1 % P/S.

RPMI medium uten FCS

RPMI 1640 tilsatt 0,1 mg pyruvat/ml, 5mM DL-Lactic acid, og 1 % P/S.

StemPro®-34 SFM Medium

500 ml StemPro®-34 SFM Medium tilsettes 13 ml StemPro-34 Nutrient Supplement og 5 ml L-glutamin

Lektinløsning

1 mg Lektin (fra *Datura Stramonium*) løses i 200 ml PBS uten kalsium og magnesium

Løsning til antistoffer

5 % BSA med 0,01 % Thimorosal løses i PBS

1,2 mM Ro 12-9786 grunnløsning

6 mM Ro 12-9786 fortynnes 1:5 i DMSO

0,75 % Agaroseløsning (lavt smeltepunkt) til kometmetoden

0,075 g NuSieve GTG lavt smeltepunkt agarose tilsettes i 10 ml av 10 mM EDTA-løsning, varmes opp til kokepunkt til agarosen er oppløst, holdes ved 37 °C i varmeblokk.

10 mM EDTA-løsning (for 0,75 % Agaroseløsning) til kometmetoden

1,86 g disodium EDTA (Na_2EDTA) løses i 500 ml PBS uten kalsium og magnesium, pH justeres til 7,4 med NaOH.

Elektroforeseløsning til kometmetoden

10 M NaOH

200 mM EDTA

Løses i destillert vann og pH justeres til 13,2 med konsentrert HCl.

Lyseringsbuffer (grunnløsning)

2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-base (=Trizma-base), løses i destillert vann og pH justeres med ca 12g NaOH/L. Tilsett 1 % N-Lauroylsarcosine natrium salt (SLS). pH justeres til 10 med HCl eller NaOH

Lyseringsbuffer til komet

Fersk lyseringsbuffer lages ved å tilsette 10 % DMSO og 1 % Triton-X til lyseringsbuffer (grunnløsning).

Enzymreaksjonsbuffer

40 mM Hepes, 0,1 M KCl, 0,5 mM EDTA. Løses i destillert vann og pH justeres til 7,6 med 7M KOH.

Nøytraliseringsbuffer

0,4 M Tris-base (Trizma base) løses i destillert vann. pH justeres til 7,5 med konsentrert HCl.

TE-buffer

1 mM EDTA, 10 mM Tris HCl løses i destillert vann og pH justeres til 8,0.

SYBR® Gold

Grunnløsning fortynnes 1:10 000 i TE-buffer

Vedlegg C

Produkter og produsenter

| Produkt | Produsent | Land |
|---|------------------------|---------------|
| Absolutt alkohol prima (100% etanol) | Arkus Kjemi | Tyskland |
| Bio Whittaker® Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) | Lonza | Belgia |
| Bio Whittaker® Trypsin EDTA | Lonza | Belgia |
| Bio Whittaker® RPMI 1640 medium | Lonza | Belgia |
| Bovine serum albumin (BSA) | Sigma-Aldrich | USA |
| Collagenase type 2 | Worthington | USA |
| Comet assay IV (bildeanalyseprogram) | Perceptive Instruments | Storbritannia |
| Corning® Ultra-low attachment 96-brønnsbrett | Corning | USA |
| Dako fluorescens monteringsmedium | Dako | Danmark |
| DL-lactic acid | Sigma-Aldrich | USA |
| DNAse I | Boehringer Mannheim | Tyskland |
| Etyl 7-okso-7h-tieno[2,3-A]-quinolisin-8-karboksylat (Ro 12-9786) | Roche | Sveits |
| Eppendorfrør, 2 ml | Sigma-Aldrich | USA |
| Falconrør, 15 ml | Nunc | USA |
| Falconrør, 50 ml | Nunc | USA |
| Fosfatbufret saltløsning (PBS) | Lokalt produsert | Norge |
| Føtalt kalveserum (FCS) | Gibco | USA |

Vedlegg C

| | | |
|---|-----------------------|---------------|
| Formamidopyrimidine-DNA-glykosylase (Fpg)-ekstrakt | Lokalt produsert | Norge |
| Gelbond® film | Cambrex | USA |
| Glycerol | Sigma-Aldrich | USA |
| Hoechst 33342 | Invitrogen | USA |
| ImmEdge hydrofob barrierepenn (PAP- penn) | Vector | USA |
| Immersol | Carl Zeiss | Tyskland |
| Lektin fra <i>Datura Stramonium</i> | Sigma-Aldrich | USA |
| L-glutamin | Sigma-Aldrich | USA |
| Mercury Short-Arc HBO® 100 W/2 lampe | Osram | Tyskland |
| NuSieve GTG agarose med lavt smeltepunkt | Cambrex | USA |
| Olympus brenner | Olympus | Japan |
| Olympus BX51 mikroskop | Olympus | Japan |
| Paraformaldehyd (PFA) | Merck | Tyskland |
| Penicillin/Streptomycin | PAA Laboratories GmbH | Østerrike |
| Polysindekkede objektglass | Menzel | Tyskland |
| Primært antistoff Anti-Vimentin | BD Biosciences | USA |
| Primært antistoff Cu/Zn SOD | Enzo Life Sciences | USA |
| Primært antistoff CD9 | BD Biosciences | USA |
| Sekundært antistoff esel anti-kanin (RRX) | Jackson | Storbritannia |
| Sekundært antistoff esel anti-mus (488) | Invitrogen | USA |

Vedlegg C

| | | |
|---|---------------|----------|
| Sekundært antistoff geit anti-rotte (488) | Invitrogen | USA |
| Sodium pyruvate | Sigma-Aldrich | Japan |
| StemPro®-34 SFM Medium | Invitrogen | USA |
| SYBR® Gold | Invitrogen | USA |
| Tellekammer (Bürker) | Labor Optik® | Tyskland |
| Thimerosal | Sigma-Aldrich | USA |
| Triton-X | Sigma-Aldrich | USA |
| Trisma® HCl | Sigma-Aldrich | USA |
| Trisma® base | Sigma-Aldrich | USA |
| Trypanblå | Sigma-Aldrich | USA |
| Trypsin | Sigma-Aldrich | USA |